

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Monika Bláhová

Vývoj a optimalizace přípravy řezových preparátů pulců
X. tropicalis pro studium migračního a diferenciačního
potenciálu testikulárních kmenových buněk

Development and optimization of sectioning technique for the
study of migration and differentiation potential of testicular stem
cells in *X. tropicalis* tadpoles

Vedoucí závěrečné práce:

doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis

Poděkování

Poděkování patří mému vedoucímu práce doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D., díky jeho přehledu, spolupráci, vedení a ochotě vznikla tato diplomová práce. Také chci poděkovat své kolegyni Mgr. Xuan Nguyen, která se nemalým podílem zasadila o vývoj nové metodiky. Dík patří též RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D., Mgr. Markétě Vegrachtové, Mgr. Janu Štundlovi, RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D., Mgr. Karolíně Strnadové, Tereze Kratochvílové a Janě Dvořákové za pomoc, psychickou podporu i rady.

Abstrakt

Rychlý rozvoj regenerativní medicíny a naléhavá potřeba buněk schopných ovládat imunitní systém nebo dokonce diferencovat do jiných buněčných typů vedla k výzkumu mesenchymálních kmenových buněk. Nápadně podobný charakter mají i Sertoliho buňky, které jsou nezbytné pro správný vývoj spermií ve varleti.

V předcházejícím výzkumu byla založena buněčná kultura z varlat juvenilních samců *X. tropicalis*, která obsahovala buňky s markery mesenchymálních kmenových buněk tak i buněk Sertoliho. Zároveň byly buňky modifikovány a do genomu jim byl zaveden gen pro červený fluorescenční protein (RFP). Cílem této diplomové práce bylo tedy objasnit vlastnosti těchto buněk po jejich mikroinjikování do embryí jedinců stejného druhu (allogenní transplantace). Pro tyto experimenty bylo nutné vyvinout spolehlivou techniku přípravy řezových preparátů, při které by nedocházelo k ztrátě buněk či celých tkání.

Metodou vibratomových řezů spolu s imunohistochemickým značením se podařilo zjistit, že buněčná kultura obsahuje buňky prekursorů Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk.

Abstract

The rapid development of regenerative medicine and the urgent need for cells which are able to modulate the immune system, or even differentiate into variable cell types, have led to the research of mesenchymal stem cells. The Sertoli cells, which are essential for the proper development of sperm in the testis, have a strikingly similar character.

In the previous research, a cell culture expressing markers of mesenchymal stem cells and Sertoli cells from juvenile male testes of *X. tropicalis* was established. At the same time, the cells were modified by the introduction of gene for the red fluorescent protein (RFP) in their genome. The aim of this diploma thesis was to clarify their characteristics after microinjection to *X. tropicalis* tadpoles (allogeneic transplantation). For these experiments, it was necessary to develop a reliable technique for the preparation of sections, which won't be harmful for the samples.

Using the vibratome sectioning method along with immunohistochemical labeling, the cell culture has been found to contain precursors of Sertoli and peritubulare myoid cells.

Obsah

Zkratky	1
Úvod	3
Modelový organismus – rod <i>Xenopus</i>	4
Mesenchymální kmenové buňky.....	5
Struktura varlete	6
Histologické metody - příprava řezových preparátů	9
Materiály.....	13
Modelové organismy.....	13
Roztoky.....	13
Na IVF (<i>In Vitro</i> Fertilization)	13
Transplantační	13
PBS	14
Fixační.....	14
Pro kryosekce	14
Pro vibratomové řezy	14
Blokovací.....	14
Bělící (bleaching solution)	15
Benzparafín.....	15
Chemikálie	15
Další materiály	15
Antibiotika.....	15
Hormony.....	15
Protilátky	16
Materiál pro přípravu řezových preparátů.....	16
Přístroje.....	16
Metody	17

Buněčná kultura	17
Transgenní testikulární buněčná kultura	17
IVF	17
Transplantace	18
Pozorování mikroinjikovaných embryí <i>X. tropicalis</i> a řezových preparátů	19
Optimalizace metodiky	19
Parafínové řezy	20
Kryosekce	20
Vibratom – příprava řezových preparátů	21
Imunohistochemické metody	22
Výsledky	24
Mikroinjekce	24
Optimalizace metodiky přípravy řezových preparátů	24
Mikrotom (data nezveřejněna)	24
Kryořezy	25
Vibratom	25
Imunobarvení	26
Výsledky – obrazová dokumentace	28
Diskuze	37
Literatura	42

Zkratky

APC	Antigen presenting cells / antigen prezentující buňky
APTS	γ -AminoPropylTrietoxySilan
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndol
DNA	DeoxyriboNucleic Acid / deoxyribonukleová kyselina
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraacetic Acid
EPO	ErythroPOetin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter / třídič buněk aktivovaný fluorescencí
FBS	Fetal Bovine Serum / fetální hovězí sérum
GGNBP2	GametoGenetin Binding Protein 2 / gametogenetin vážící protein 2
HEPES	2-[4-(2-HydroxyEthyl)Piperazin-1-yl]EthaneSulfonic acid
hCG	human ChorioGonadotropine / lidský choriogonadotropin
IC	Imprinting Cytology / „obtisková“ cytologie
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3 – DiOxygenase
IVF	<i>In Vitro</i> fertilization / umělé oplodnění
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LMA	Low melting point agarose / agaróza tající při nízkých teplotách
MHC	Major Histocompatibility Complex / Hlavní histokompatibilní komplex
MEMFA	MOPS + EGTA + Magnesium sulfate + FormAldehyde buffer
MOPS	3-(N-MOrpholino)PropaneSulfonic acid
MMR	Mark's Modified Ringers buffer
MSC	Mesenchymal Stem Cell / mesenchymální kmenové buňky
MyoD	Myogenic Differentiation protein / myogenický diferenciační protein
PBS	Phosphate Buffered Saline / pufrovaný fyziologický roztok
PBST	PBS + Tween 20

PCR	Polymerase Chain Reaction / Polymerázová řetězová reakce
PTMC	PeriTubular Myoid Cell / peritubulární myoidní buňky
RFP	Red Fluorescent Protein / červený fluorescenční protein
RLSC	Resident Liver Stem Cells / residentní jaterní kmenové buňky
RNA	RiboNucleic Acid / ribonukleová kyselina
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium
SC	Stem Cells / kmenové buňky
SMA	Smooth Muscle Actin / actin hladké svaloviny
SOX	SRY-related HMG-box / se SRY příbuzný protein z HMG skupiny
SPRF	Self-Pressurized Rapid Freezing / „samopřetlakové rychlozmrazování“
TGFβ	Transforming Growth Factor β / transformující růstový faktor β
TNB	Tris-NaCl-Blocking buffer / tris-NaCl-blokovací pufr
TSC	Testicular Stem Cell / testikulární kmenové buňky

Úvod

Mesenchymální kmenové buňky patří mezi významné buněčné typy v regenerativní medicíně. Mají značný diferenciační potenciál a zároveň jsme schopni je získat i s dospělých jedinců. S úspěchem už byly využity k léčbě například osteoartritidy (Mardones et al., 2017) či diabetu typu 2 (Zang et al., 2017) díky jejich schopnostem produkovat různé buněčné modulátory, růstové faktory a cytokiny. Podobné imunomodulační vlastnosti mají i Sertoliho buňky. Ty tvoří ochrannou bariéru pro vyvíjející se pohlavní buňky v semenotvorných kanálcích varlete, a díky schopnosti potlačovat imunitní systém byly využity při allogenních a dokonce i xenogenních transplantacích (Fallarino et al., 2009).

Pro výzkumné účely bylo nutné najít modelový organismus, který má rychlý embryonální vývoj. Abychom také mohli sledovat, jak jedinci rostou, musel se experimentální model vyvíjet mimo tělo matky. Oba tyto předpoklady zajistil modelový organismus *Xenopus tropicalis*.

Po vytvoření geneticky modifikované buněčné kultury testikulárních buněk z varlat juvenilních samců *X. tropicalis* bylo jen otázkou času, kdy bude studován vliv modifikovaných buněk na živý organismus. Z předchozích experimentů bylo jasné, že buňky mají charakter mesenchymálních kmenových buněk a zároveň exprimují markery Sertoliho buněk. To znamená, jak bylo řečeno výše, že mají potenciál k modulaci imunitního systému a zároveň jsou schopné diferencovat do jiných buněčných typů.

Ve výzkumu, který předcházel této diplomové práci, byl také zkoumán diferenciační potenciál těchto buněk. Nicméně předešlé metody přípravy a úpravy řezových preparátů nebyly tak účinné a bylo tedy nutné zavést spolehlivou a stabilní metodu pro další studie. To se stalo cílem této práce. Postupem času byla vyvinuta jednoduchá metodika, se kterou bylo možné sledovat další vývoj transplantovaných buněk v tělech pulců drápatky tropické (*Xenopus tropicalis*). Diferenciační potenciál modifikovaných buněk byl zjišťován pomocí imunohistochemických metod.

Výsledky této práce a následujícího výzkumu jsou nezbytnou součástí výzkumu kmenových buněk a doplní již tak pestrou mozaiku poznatků o jejich možnostech využití.

Modelový organismus – rod *Xenopus*

Obojživelníci z rodu *Xenopus* jsou ve výzkumu i medicíně velmi známými a významnými modelovými organismy. Koncem 30. let 20. století se začali používat pro testování gravidity. Umožňovala to jejich citlivost k lidskému choriogonadotropinu (hCG – human ChorioGonadotropine / lidský choriogonadotropin), který se vyskytuje v moči těhotných žen. Injekce malého množství moči s obsahem hCG u samic drápatky vodní (*Xenopus laevis*) stimuluje kladení oocytů do 8-12 hodin. (Gurdon and Hopwood, 2000) Díky tomu, že oplození i vývoj jedinců probíhá mimo tělo samice a oocyty jsou velké (1,5 – 2 mm), je možné jednoduše pozorovat morfologické změny na embryích či s nimi manipulovat. Xenopí zárodky jsou velmi odolné vůči vnějším chirurgickým zákrokům. Do oocytů drápatek je možné injikovat roztoky nukleových kyselin či jiných, například radioaktivně značených látek. Do časných zárodků (blastula) či pulců je možné transplantovat celé buňky a pozorovat jejich migraci a diferenciaci (Tlapáková et al., 2016).

Rod *Xenopus* se vyznačuje poměrně nenáročnými podmínkami chovu, ať již z hlediska krmení či prostředí. Mezi další klady těchto obojživelníků také patří velké množství potomků, kteří se relativně rychle vyvíjejí. Výhodou je také značná podobnost některých orgánů s člověkem, například v případě plic, brzlíku nebo slinivky. (Harland and Grainger, 2011; Kashiwagi et al., 2010)

Nejčastějšími druhy užívanými jako modelové organismy v laboratořích jsou *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis*. Přestože *X. laevis* je déle využíván pro výzkumné účely, v poslední době je více upřednostňován *Xenopus tropicalis*, jehož genom je na rozdíl od drápatky vodní diploidní. Srovnání obou druhů je možné shlédnout v *tabulce 1*. V laboratořích se dnes nejvíce užívá pět linií *Xenopus tropicalis*, linie Nigerian, Ivory Coast, Yasuda, Asashima a Golden (Kashiwagi et al., 2010).

	<u><i>X. laevis</i></u>	<u><i>X. tropicalis</i></u>
Genom	allotetraploid	diploid
Velikost oocytů	≈1,2 mm	≈0,7 mm
Počet oocytů na jedno naklazení	1 000-9 000	300 – 1 000
Dosažení pohlavní dospělosti (po metamorfóze):		
samice	10 – 24 měsíců	30 týdnů
samec	6 měsíců	22 týdnů

Tabulka 1: Porovnání *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis* (Kashiwagi et al., 2010)

Mesenchymální kmenové buňky

Základní stavební jednotkou všech organismů je buňka. V tělech mnohobuněčných živočichů se rozlišují skupiny buněk s určitou funkcí. Některé zajišťují transport plynů po těle, jiné sekretují látky napomáhající trávení, ale jsou také buňky, které se starají o obnovu, regeneraci tělesných soustav. Tyto buňky se nazývají kmenové (SC - Stem Cells).

Aby buňka mohla být nazvána kmenovou musí splňovat určité podmínky. Zaprvé musí být schopna sebeobnovy, tedy po dělení zajistit vznik dvou dceřiných buněk, kde si minimálně jedna udrží kmenový charakter. Za druhé jsou tyto buňky schopné se diferencovat do jiných buněčných typů. Z toho vyplývá, že SC se nejčastěji dělí asymetricky, to znamená, že vznikají dvě dceřiné buňky, které nejsou stejné.

Kmenové buňky můžeme dělit podle jejich schopnosti se diferencovat na totipotentní, které dají vzniknout celému organismu včetně extraembryonálních tkání, pluripotentní, schopné vytvořit všechny tkáně kromě trofoblastu a nakonec multipotentní kmenové buňky, jejichž diferenciační potenciál je více či méně omezený. Jako příklad multipotentní kmenové buňky může sloužit hematopoetická kmenová buňka, z níž se po dělení vytvoří buď myeloidní či lymfoidní progenitor, který zajišťuje tvorbu mnoha dalších druhů buněk od bílých krvinek až po krevní destičky. Poslední jsou buňky unipotentní. Ty se po rozdělení mohou diferencovat jen v jeden buněčný typ.

Buňky s kmenovým charakterem je ale také možné dělit podle jejich původu. Nejčastěji se pak tyto buňky rozlišují na embryonální a dospělé nebo také somatické kmenové buňky. Oba typy je pak možné dále dělit i podle tkání, ze kterých jsou odvozeny, například nádorové, zárodečné či mesenchymální.

Mesenchymální kmenové buňky (MSC - Mesenchymal Stem Cell) jsou jedním z typů dospělých tkáňově specifických kmenových buněk, které mají multipotentní charakter. Nejčastěji se získávají z kostní dřeně, ale je možné je izolovat také z tukové tkáně, kloubního mazu, vlasového váčku či varlat. Jedinečnou vlastností MSC je jejich schopnost regenerace poškozené tkáně. Zároveň ale díky nízké expresi MHC třídy II (Major Histocompatibility Complex - povrchové glykoproteiny uplatňující se při rozeznávání buněk a jejich interakci s imunitním systémem) nevyvolávají imunologickou reakci a jsou schopné juxtakrinně a parakrinně ovlivňovat imunitní

systém (pozitivně i negativně). (Zang et al. 2017) Proto jsou tyto buňky v dnešní době velmi studované především v oblastech regenerativní medicíny (Maleki et al., 2014).

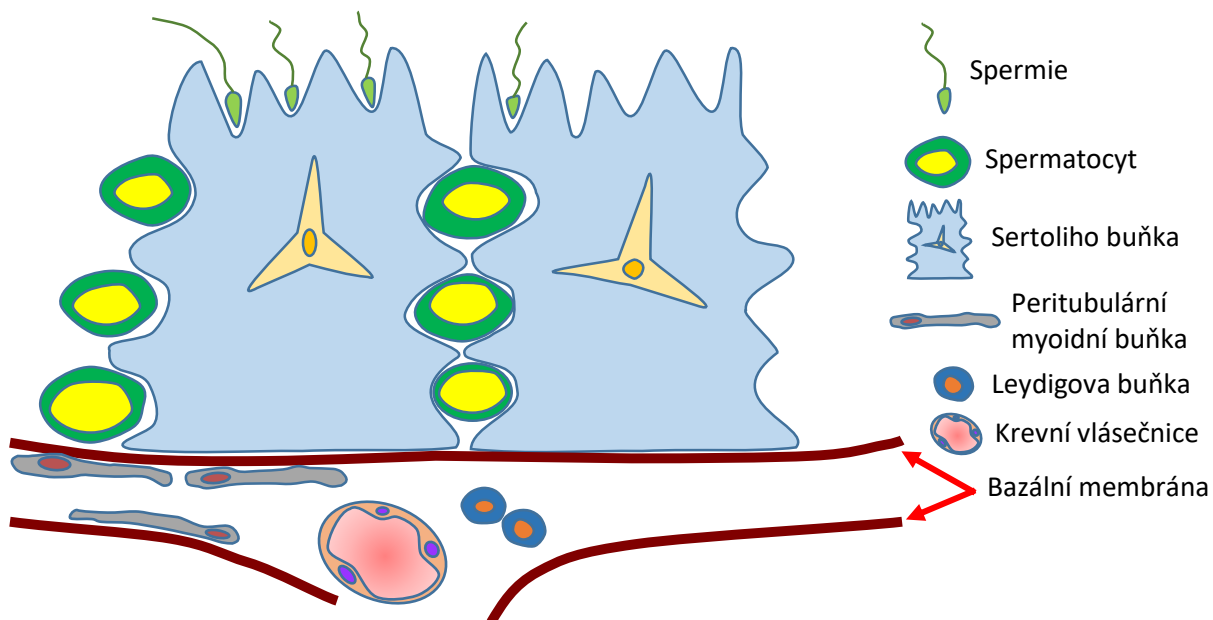
Mardones et al. (2017) ve své studii s úspěchem použili MSC k léčbě osteoartritidy. Využili schopnosti MSC migrovat do míst poranění a připravit vhodnou niku pro diferenciaci chondrocytů a opravit tak poškozenou tkáň. Aby léčba byla úspěšná, bylo potřeba, aby injikované MSC kromě osídlení postiženého místa byly schopné zvládnout i vlastní diferenciaci v chondrocyty. To zahrnuje nejen jejich fyzickou přeměnu ale také schopnost produkce a zachování extracelulární matrix, která je typická právě pro chrupavku. V neposlední řadě bylo nezbytné, aby injikované buňky byly schopné produkovat různé růstové faktory a cytokiny. Pacientům byly podána infúze jejich vlastních buněk, které byly izolovány z kostní dřeně a testovány na životaschopnost, expresi určitých membránových markerů a mikrobiologický stav.

V této diplomové práci jsem se zabývala jedním z typů mesenchymálních buněk, Sertoliho buňkami. Sertoliho buňky (SC - Sertoli Cell) jsou nepostradatelné pro správné dozrávání spermií a tvorbu buněčné bariéry zabraňující průniku imunitního systému do semenotvorných kanálků (Kaur et al., 2014). Během výzkumu jsme zjistili, že buněčná kultura založená v laboratoři vedoucího diplomové práce obsahuje prekursor Sertoliho buněk a peritubulárních myoidních buněk (Tlapáková et al., 2016). Oba typy buněk jsou více rozebrány v následující kapitole.

Struktura varlete

Testikulární prekursorové buňky, se kterými jsem pracovala, byly získány z varlat juvenilních samců *Xenopus tropicalis*. Varle je součástí reprodukčního systému samců a je tvořeno především semenotvornými kanálky, v nichž dozrávají pohlavní buňky ve spermiu v procesu zvaném spermatogeneze (schématické vyobrazení kanálku je na *Obrázku 1*).

Samotné semenotvorné kanálky se sestávají hlavně ze Sertoliho buněk nasedajících na basální membránu. Za bazální membránou se pak nacházejí peritubulární myoidní buňky (PTMC – PeriTubular Myoid Cell) zajišťující svalový stah a tím vypuzení spermií z varlete. Spolu se SCs také zajišťují tvar kanálků a jsou nezbytné pro agregaci SCs *in vitro* (Tung and Fritz, 1980). PTMCs mají také receptory pro androgeny, které jsou důležité pro jejich správný vývoj. Potvrzení této hypotézy přinesla mezinárodní vědecká studie, pro jejíž účely byly vytvořeny myši s knockoutovanými androgenními receptory u PTMCs. Neplodnost byla zapříčiněna především sníženou hmotností varlat a výrazným snížením počtu pohlavních buněk. Zároveň byla narušena i funkce SCs, čímž se současně potvrzuje úzká spolupráce mezi PTMCs a SCs. (Welsh et al., 2009)



Obrázek 1: Schéma semenotvorného kanálku

V semenotvorných kanálcích se dále nachází Leydigovy buňky, které syntetizují a vylučují androgeny, ale také se podílejí na správném vývoji spermií. Během vývoje jedince prochází Leydigovy buňky třemi vývojovými stupni: fetální, novorozenecký a dospělý. V průběhu všech těchto období je produkce testosteronu odvozena od počtu těchto buněk. Na biosyntetické dráze produkce androgenů ve varleti jsou velmi podstatné čtyři enzymy, z nichž dva se nacházejí pouze v Leydigových buňkách (jsou to cytochrom P450 enzym sestřihující vedlejší řetězec cholesterolu a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza). (Shalet, 2009)

Další podstatnou součástí varlat jsou endoteliální buňky, které vytváří síť krevních vlásečnic ve varlatech a zajišťují tak výživu i informační tok v podobě hormonů pro ostatní buňky.

Jak už bylo zmíněno výše, uvnitř semenotvorných kanálků jsou především Sertoliho buňky, které zajišťují nejen správný vývoj pohlavních buněk, ale jsou též odpovědné za jejich výživu, pohlcování odpadního materiálu vylučovaného při jejich vývoji a v neposlední řadě za jejich ochranu před imunitním systémem (Kaur et al., 2014). Nezbytnost patřičně vyvinutých Sertoliho buněk při zrání gamet potvrdila i studie Chen et al. (2017). Autoři se zde zaměřili na výzkum tumor-supresorového proteinu GGNBP2 (GametoGenetin Binding Protein 2/gametogenetin vážící protein 2). O důležitosti GGNBP2 vypovídalo už to, že mnoho myších embryí bez tohoto genu zemřelo okolo 14. dne nitroděložního vývoje. U přeživších narozených samců byla poté zjištěna morfologicky nesprávně vyvinutá varlata a zvýšení apoptotických buněk. Zároveň v jejich varlatech úplně chyběly Sertoliho buňky pozitivní na SOX9. Tento protein patří mezi důležité faktory pro zrání Sertoliho buněk a zároveň slouží jako marker dospělých varlat s korektní spermatogenezí.

Jednou z důležitých funkcí Sertoliho buněk je i modulace imunitního systému. Sertoliho buňky vytváří nejen fyzickou zábranu mezi dozrávajícími spermii a vnějším prostředím tzv. hematotestikulární bariéru (více informací v *tabulce 2*), ale také dokáží produkovat imunoregulační molekuly jako například TGF- β (Transforming Growth Factor β /transformující růstový faktor β) nebo IDO

V tělech živočichů se nacházejí místa, která musejí být chráněna před přístupem určitých látek nebo imunitních buněk, aby nebyla vyvolána imunitní reakce. Mohou v nich totiž nacházet buňky, které mají na svých membránách antigeny, jenž by mohly být rozeznány jako cizorodé. Je tak nutné vytvořit *bariéru* mezi krví a určitou tkání. Nejznámějším rozhraním mezi krví a tak zvanými imunoprivilegovanými místy jsou hematoencefalická, hematotestikulární, hematothymická či placentární bariéra. Tyto bariéry nejsou jen fyzickými překážkami, ale zároveň se v nich nacházejí buňky, které dokáží uvolňovat látky, jimiž modulují reakci okolních buněk a tedy i těch imunitních. (Kaur et al., 2014)

(Indoleamine-pyrrole 2,3 – DiOxygenase/ *Tabulka 2: Krevní bariéry* indolamin-pyrrol 2,3 - dioxygenáza), kterými usměrňují buňky imunitního systému. Jedním typem z cílových buněk, jež jsou pod vlivem Sertoliho buněk, jsou regulační T lymfocyty. Zatím však není jasné, zda je řídí přímo či nepřímo přes APCs (Antigen

presenting cells/antigen prezentující buňky), které mají schopnost předvádět antigeny z pohlcených částic v těle, čímž mohou indukovat imunitní reakci. (Kaur et al., 2014)

Této schopnosti modulace bylo využito ve studii od Fallarina et al. (2009) , kdy myším s diabetem typu I transplantovali zapouzdřené Sertoliho buňky. Z 21 pokusných myší 4 zahynuly mezi 60. až 90. dnem po transplantaci. Dalších 17 myší přežilo více jak 120 dní a navíc deset z nich se stalo normoglykemickými. Kontrolní skupina čítající 18 diabetických myší obdržela transplantát s prazdnými kapslemi. U všech se rozvinul diabetes a zahynuly v období od 28. do 62. dne od transplantace. Autoři studie také zjistili, že Sertoliho buňky bránily autoimunitní reakci proti pankreatickým β buňkám, kterým tím bylo umožněno zregenerovat a vytvořit funkční Langerhansovy ostrůvky, z nichž byl opět produkován inzulin.

Předmětem této diplomové práce bylo studium diferenciačního potenciálu prekursorů Sertoliho buněk odvozených z varlat juvenilních samců drápatky tropické (*Xenopus tropicalis*). Relativně velká embrya a pulci, kteří jsou z velké části transparentní umožňují transplantace výše uvedených buněk s následnou imunohistochemickou analýzou řezových preparátů. Podstatná část diplomové práce byla věnována nalezení nejvhodnější metody přípravy řezových preparátů z transplantovaných pulců *X. tropicalis*.

Histologické metody - příprava řezových preparátů

Pro identifikaci buněk v těle jedince se nejběžněji používají histologické metody. Z těla jedince se odebere vzorek, z něhož jsou vytvořeny řezové preparáty, které jsou následně ošetřeny různými typy značení. Značení umožňuje rozlišovat nejen jednotlivé typy buněk ale i metabolity či proteiny, jež buňky vytvářejí. Tkáň z organismu se může odebrat dvěma způsoby a to buď z živého jedince, čemuž se říká *biopsie*, nebo z mrtvého těla, což je označováno jako *nekropsie*. Po odběru tkáně je nutné vzorek fixovat, aby nedocházelo k degradaci buněk díky vlastním enzymům a působením vnějších vlivů.

Fixace vzorku může být provedena v zásadě dvěma způsoby či použitím kombinace obou přístupů. Prvním typem fixace je tzv. *fyzikální metoda*. Využívá se při ní vysoká či naopak nízká teplota. Fixace teplem je často využívána v mikrobiologii, kdy se na podložní sklíčko nanasou bakterie a sklíčko je protaženo nad plamenem kahanu. Pro fixaci tkáně se v laboratořích využívá řízený ohřev v mikrovlnné troubě

při teplotě kolem 50°C. Problémem často bývá degradace různých proteinů v buňkách. Ve studii z roku 2015 ověřovali účinnost tepelné fixace při 95°C po dobu 30 vteřin. Dokázali nejen, že tento způsob fixace je efektivní proti jednořetězcovým RNA virům a Gram-negativním bakteriím, ale zároveň je také možné takto fixované vzorky tkáně využít pro proteinovou/peptidickou či lipidickou analýzu. (Cazares et al., 2015)

Při pěstování buněčných kultur se často využívá fixace mrazem a vzorky se poté dlouhodobě uskladňují. Nevýhodou je, že při zamrazování dochází k tvorbě mikrokystalů vody uvnitř tkáně či buněk, které mohou vzorek poškodit. Aby se vzniku krystalů předešlo, užívají se tzv. kryoprotektiva. Ta jsou ale pro buňky toxická, což snižuje celkovou životaschopnost rozmrazených buněk. Huebinger et al. (2016) dokázali techniku kryofixace vylepšit díky optimalizaci metody SPRF (Self-Pressurized Rapid Freezing / „samopřetlakové rychlozmrazování“), založené na vytvoření vnitřního přetlaku díky expanzi vody a hexagonálnímu ledu, což vede k vitrifikaci (jev, při kterém se látka přemění na nekystalickou amorfni pevnou látku). Za těchto okolností není nutné užívat kryoprotektiva a vzorek je možné rozmrazit a běžně užívat.

Druhý typ fixace tzv. *chemická metoda* je založena na užití fixační tekutiny, do které je vzorek ponořen nebo je (v případě živočichů) tekutina vstříknuta do těla organismu. Mezi nejčastěji užívané fixační tekutiny patří formaldehyd či methanol. V publikaci Lerch et al. (2017) autoři sledovali průběh fixace vzorku formaldehydem. Tato data mohou napomoci při vylepšování fixačních protokolů. Při experimentu sledovali dva typy fixace formaldehydem, první byla založena na šestihodinové inkubaci tkáně ve fixační tekutině při 4°C následované 1 hodinou fixace při 45°C. Druhý způsob obnášel fixaci za pokojové teploty po 24 hodin. K analýze použili 34 druhů lidské tkáně a 12 typů poškozených tkání. Zjistili, že difúze tekutiny je pro každou tkáň specifická a liší se dokonce i zdravá tkáň od nemocné přestože pocházejí ze stejného orgánu.

Po fixaci je nutné vzorky připravit na řezání, nejčastěji se vzorky zalévají do parafínu a poté řezají na mikrotomu. Vzniklé řezy mají velikost 6-10 µm i menší. Výhodou takto připravených preparátů je jejich dlouhá životnost. Vzorky mohou při správném provedení postupu a skladování vydržet i několi desítek let. Toho se dá využít především při sledování vývoje pacientova stavu, například při biopsiích nádorových tkáních, nebo jako učebních pomůcek při vyučování studentů. Dlouho se myslelo, že tkáně fixované ve formalínu a zalité do parafínu se nedají již dále používat

pro další diagnostické metody jako je sekvenování DNA či PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce). Díky rozvoji technologií však byla tato domněnka vyvrácena.

Ve studii Einiga et al. (2017) podrobili parafínové řezy srovnání s čerstvě odebranou a zmrazenou tkání. Zjistili, že vzorky připravené parafínovou metodou jsou stejně vhodné pro další sekvenování jako vzorky z čerstvé tkáně. Ve studii používali převážně tkáň odebranou z krys ale také lidská játra. Navíc popsali postup jak nejlépe ošetřit odebranou tkáň, aby se co nejméně poničila struktura DNA. Zaměřili se také na vzorky, které už byly imunohistochemicky obarveny. Zkoumali jejich kvalitu pro další použití, a dokonce se snažili odhalit, kde v průběhu postupu barvení dochází k největšímu poničení DNA v buňkách. K tomu dochází při ošetření vzorku citrátovým pufrům, který se používá k odhalení epitopů, jež by mohly být v důsledku fixace skryty.

V obdobné studii Iddawela et al. (2017) podrobovali zkoumání vzorky připravené formalínovou fixací a zalitím do parafínu. Tentokrát se výzkumníci zaměřili na kvalitu vzorků z hlediska studia molekulárních markerů. Soustředili se na rakovinové markery a to zejména na markery rakoviny prsu. I oni dospěli ke zjištění, že parafínové řezy mají mnohostranné využití. Z 63 testovaných pacientek proběhla úspěšná extrakce DNA u 43 a v případě RNA získali 52 vzorků. Odebrané vzorky pak byly testovány na genovou expresi a analýzu počtu kopií v genomu.

I přesto zalití do parafínu není nejlepším řešením pro všechny tkáně. V případě této diplomové práce jsme se potýkali s velkými problémy při přípravě řezových preparátů. Tkáň z řezů vypadávala a nebylo možné postoupit k dalším krokům identifikace buněk. Bylo tedy nutné změnit metodu přípravy řezů.

Alternativní přístup představuje metoda kryosekce. Při níž se využívá přístroj kryomikrotom (kryostat). Fixované vzorky jsou zality do speciálního media, po jehož zatuhnutí je možné vytvářet řezy o velikosti kolem 10 μm v prostředí od -10 do -25°C .

Preparáty zpracované pomocí kryosekce jsou vhodné pro rychlou diagnostiku. Výhodou je, že se odebraná tkáň nemusí fixovat a odpadá i nutnost několika denní přípravy preparátů, jak je tomu u standardních parafínových řezů. Je však nutné podotknout, že kryorezy jsou více náchylné na poškození a jelikož nejsou fixované, jejich životnost je značně snížena. Stává se také, že při špatném postupu přípravy se při zamrzání vzorku vytvoří v tkáni krystalky, které mohou vzorek poničit. Navíc je tato metoda náchylnější na vznik artefaktů.

Studie Mahadevappa et al. (2017) zkoumala efektivitu stanovení diagnózy právě pomocí kryořezů a tzv. metody Imprinting Cytology (IC) ¹. Na 62 případech pacientek s rakovinou prsu dokázali, že senzitivita, specifita a přesnost obou metod přesahuje ve všech případech 95 %. Pro ověření správnosti dosažených výsledků používali klasické parafínové řezy vytvořené z odebraných tkání. Rozdíl mezi kryořezy a IC je v rychlosti stanovení a získaným poznatkům. Metodou IC je možné stanovit pouze, jestli se jedná o maligní nebo benigní nádor. Kryořezy jsou schopné rozlišit i mezi jednotlivými stádii nádoru, přestože jejich příprava je delší. Nicméně jsou obě tyto metody proveditelné během operace, což umožňuje lékařům v některých případech řešit zdravotní komplikace pacienta již během jednoho zákroku.

Avšak i tuto metodu jsme museli během výzkumu také nahradit jinou. Přestože problém s vypadáváním tkáně jsme vyřešili, na řezech bylo prakticky nemožné rozlišit o jakou část pulce se jedná či v jakém orgánu se transfekované buňky nacházejí.

Rozhodli jsme se tedy pro méně známou techniku přípravy řezových preparátů pomocí přístroje vibratom. Vzorky jsou zalévány do agaru či speciálního média. Po zatuhnutí jsou bločky s tkání vloženy do vaničky s neutrálním roztokem (například PBS). Samotné řezání je prováděno velmi rychle kmitající žiletkou. Až tato metoda nám přinesla kýžené výsledky. Přestože bylo nutné připravovat preparáty o síle v rozmezí 30 – 40 μm , mohli jsme pozorovat jak samotné buňky, tak i tkáně, ve kterých se nacházely. Bylo možné zjistit, do jakého orgánu migrovaly. Díky vibratomovým řezům jsem mohli také připravovat řezy ze starších stádií pulců.

¹ Na sklíčko je nanesen malý řez tkáně, u které chce chirurg zjistit, zda je maligní či nikoli. Tento řez je poté fixován v 95% ethanolu po dobu 5-6 s a následně obarven standardním hemaxilin-eosinovým barvením. Vše se děje při operaci pacienta, který je v anestezii.

Materiály

Modelové organismy

V diplomové práci byly k pokusům užiti jedinci druhu *Xenopus tropicalis*, kteří jsou chováni na PřF UK. Konkrétně se jednalo o kmeny Nosek PřF

UK, Ivory Coast (inbrední kmen) a Nigerian Strain (outbrední kmen). Kmen Nosek

PřF UK je kmen vyšlechtěný přímo na Přírodovědecké Fakultě. Pokusní živočichové z kmene Ivory Coast a Nigerian Strain laboratoř obdržela od European Xenopus Resource Centre (Portsmouth).

K transplantacím testikulárních kmenových buněk (TSC – Testicular Stem Cell) byli primárně používáni jedinci kmene Nosek PřF UK.

V chovech na fakultě se udržuje teplota místnosti okolo 26°C. Do plastových kádí je vždy rozděleno 60-80 jedinců. Do plastových nádob se napouští pitná voda, do které se přidává mořská sůl (25 g na 100 l), aby byla zajištěna dostatečná salinita. Žabí embrya, pulci a mladé žáby jsou chovány odděleně v menších plastových nádobách. Pravidelná údržba nádob a krmení se uskutečňuje každý pracovní den.

Roztoky

Na IVF (*In Vitro* Fertilization)

20x MMR: 2M NaCl; 40mM KCl; 20mM MgCl₂; 40mM CaCl₂; 100mM HEPES; deionizovaná H₂O; pH upraveno na 7,7-7,8

0,05x MMR: 2,5 ml 20x MMR; doplněno deionizovanou H₂O do 1000 ml; pH 7,7-7,8

0,05x MMR + Gentamycin: 2,5 ml 20x MMR; doplněno deionizovanou H₂O do 1000 ml; 1 ml Gentamycinu; pH 7,7-7,8

1x MMR + Gentamycin: 5 ml 20x MMR; doplněno deionizovanou H₂O do 100 ml; 100μl Gentamycinu; pH 7,7-7,8

2,2% roztok cysteinu: 0,5 ml 20x MMR; doplněno deionizovanou H₂O do 100 ml; 2,2 g L-cysteinu; pH 7,7-7,8

1% roztok agarózy v 0,05x MMR

Transplantační

Ficoll: 0,5 ml 20x MMR, 0,1 ml Gentamycinu; 6g Ficoll; doplněno deionizovanou H₂O do 100 ml; pH 7,7-7,8

0,2% MS-222, uspávací roztok: 0,2 g MS-222; 0,2 g NaHCO₃; 100 ml destilované H₂O
0,4% MS-222, usmrcovací roztok: 2 g MS-222; 2 g NaHCO₃; 500 ml destilované H₂O

PBS

10x PBS (phosphate buffered saline): 136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 2,25 mM KH₂PO₄; pH 7,35

1x PBS: 1 díl 10x PBS, 9 dílů destilované vody

2/3 PBS: 2 díly PBS, 1 díl destilované vody

Fixační

3,8% formaldehyd v 1x PBS: 40 ml formaldehydu; 36 ml 10x PBS; 324 ml destilované vody

10x MEMFA: 20,926 g 1M MOPS; 7,608g 20mM EGTA, 2,465 g 10mM MgSO₄ rozpustit ve 100 ml destilované vody (pomocí NaOH upravit pH na 7,8)

Fixační MEMFA: 1 díl 10x MEMFA, 1 díl 38% formaldehydu, 8 dílů destilované vody

Pro kryosekce

7,5% sacharóza v 2/3 PBS

15% sacharóza v 2/3 PBS

30% sacharóza ve 2/3 PBS

7,5% želatina v 15% sacharóze

15% želatina v 15% sacharóze

20% želatina v 15% sacharóze

Pro vibratomové řezy

3% agaróza 1x PBS

PBST: 100 ml 1x PBS; 0,1 ml Tween 20

Blokovací

TNB: 0,1M Tris-HCl; 0,15M NaCl; 0,5% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim GmbH)

Bělící (bleaching solution)

5 ml: 3,5 ml 100% metanol; 0,5 ml 30% H₂O₂; 1 ml deionizované vody

Benzparafín

1 díl parafínu ku třem dílům benzenu

Chemikálie

38% Formaldehyd 30251 (Lach-Ner)

Agaróza 50004 (Lonza)

Cystein C7352 (Sigma-Aldrich)

DAPI DES1000L (Intimex)

Ficoll F4375 (Sigma-Aldrich)

MS222 A5040 (Sigma-Aldrich)

Triton X-100 36324N (BDH)

Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Parafín Paraplast Plus 502004 (McCormick Scientific)

Sacharóza 84100G1000 (Penta)

Želatina 1040781000 (Emprove)

Mowiol/DAPI

Metanol (Penta)

Etanol (Penta)

MOPS (Sigma-Aldrich)

MgSO₄ (Penta)

Benzen10720-11000 (Penta)

Etanol absolutní 71250-11000 (Penta)

Další materiály**Antibiotika**

Gentamicin - Gentaveto - 5 (V.M.D.)

Hormony

Lidský hCG C1063 (Sigma-Aldrich)

Protilátky

Primární protilátky:

1E12 (anti-actinin; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:4

14h7 (anti-vimentin; Developmental Studies Hybridoma Bank) – 1:40

D7F2 (anti-MyoD; Developmental Studies Hybridoma Bank) - 1:20

TBX20 (marker progenitorů kardiomyocytů; Aviva Systems Biology) – 1:300

Zn12 (povrchový marker neurálních buněk; Developmental Studies Hybridoma Bank)
- 1:500

anti-Sma (Sigma-Aldrich) – 1:400

anti-Sox9 (Sigma-Aldrich) – 1:300

Sekundární protilátky:

Alexa 488 anti-mouse (Thermo Fisher Scientific) – 1:500

Alexa 555 anti-mouse (Thermo Fisher Scientific) – 1:500

Alexa 488 anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific) – 1:500

Materiál pro přípravu řezových preparátů

Podložní skla Superfrost (Thermo scientific)

Podložní skla (P-Lab)

Žiletky (Astra Superior Platinum)

Zamrazovací bločky Cryomold Biopsy 4565 (Tissue-Tek®)

Zamrazovací médium: O.C.T.™ Compound 4583 (Tissue-Tek®)

Kultivační destičky (P-Lab)

Petriho misky (P-Lab)

Přístroje

Binolupa Stemi 2000 (Zeiss)

Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)

Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf)

Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen)

Elektroforetický zdroj Power station 300 (Labnet Internacional)

Fluorescenční binolupa Olympus SZX16 (Olympus Optical)

Fluorescenční mikroskop Olympus BX40 (Olympus Optical)

Mikroinjektor IM 300 (Narisige)
Mikrotom HM 310 (Microm)
Kryostat CM3050 S (Leica)
Vibrom VT 1200S (Leica)
Nahřívací ploténka VD-1 (Vezas)
Vodní lázeň Techne TE 10D Tempette (Techne)
Hybridizační pec HO - 10 (Stovall Life Science)

Metody

Buněčná kultura

V laboratoři vývojové biologie byla založena buněčná kultura z varlat juvenilních samců *Xenopus tropicalis* z linie Ivory Coast. Primární kultura byla vytvořena z varlat odebráných jedincům šest měsíců po metamorfóze. Explantáty byly uchovávány 5 dní při 29,5°C a 5,5% CO₂ atmosféře bez jakéhokoli zásahu. Primární kultura byla připravena celkem čtyřikrát, po každé z jiného jedince, ale všechny kultury vykazovaly stejné morfologické a molekulární biologické vlastnosti..

Pro klutivaci testikulárních buněk z *X. tropicalis* bylo vyvinuto speciální RPMI médium obohacené o pyruát sodný, 2–merkaptoetanol a rekombinantní myší leukemický inhibiční faktor. Médium se mění každé tři dny a buňky se pasážují jednou za dva týdny.

Transgenní testikulární buněčná kultura

Do testikulárních kmenových buněk byl nukleofekcí zaveden plasmidový vektor ISpBSIISK-CAG-Katushka RFP. Po měsíci kultivace byly buňky pozitivní na expresi Katushka RFP vyselektovány metodou FACS na základě fluorescenčního signálu.

IVF

Při *in vitro* fertilizaci (smíchání oocytů se spermiovou suspenzí v Petriho misce) je účelné vývoj aktivovaných a oplozených oocytů pozastavit (synchronizovat). K tomu se využívá roztoku o vysoké iontové síle, 1x MMR. Gentamicin slouží pro ochranu vyvíjejících se zárodků před bakteriální infekcí. Po 3-5 minutách od aplikace spermiové suspenze k oocytům je Petriho miska zalita roztokem 0,05x MMR, jehož nízký obsah iontů umožní znovuzahájení embryonálního vývoje. Oocyty drápatek mají na svém

povrchu relativně silný gelový obal, který je nutné po 20-25 minutách od oplození odstranit roztokem 2,2% cysteinu, který se připravuje vždy čerstvý, max. 2 hodiny před oplozovací procedurou. Roztoky MMR se zpravidla připravují 1-2 dny před pokusem. V této době se také chystají Petriho misky, jejichž dno se pokrývá 1% roztokem agarózy rozmíchané v 0,05x MMR.

Den před samotným IVF bylo dvěma až čtyřem samicím *X. tropicalis* injikováno 15 IU hCG (později navýšeno na 30 IU) do lymfatického vaku. Ráno v den experimentu dostaly samice další injekci s hormonem, tentokrát 150 IU (později zvýšeno na 300 IU). Zhruba čtyři až pět hodin po podání druhé dávky hormonu samice započaly klást oocyty. V této době byl také zabit samec (vložením do 0,4% roztoku MS-222), dekapitován a byla mu odebrána varlata, která byla uložena do misky obsahující médium L15 s 10% FBS (obé od Sigma-Aldrich).

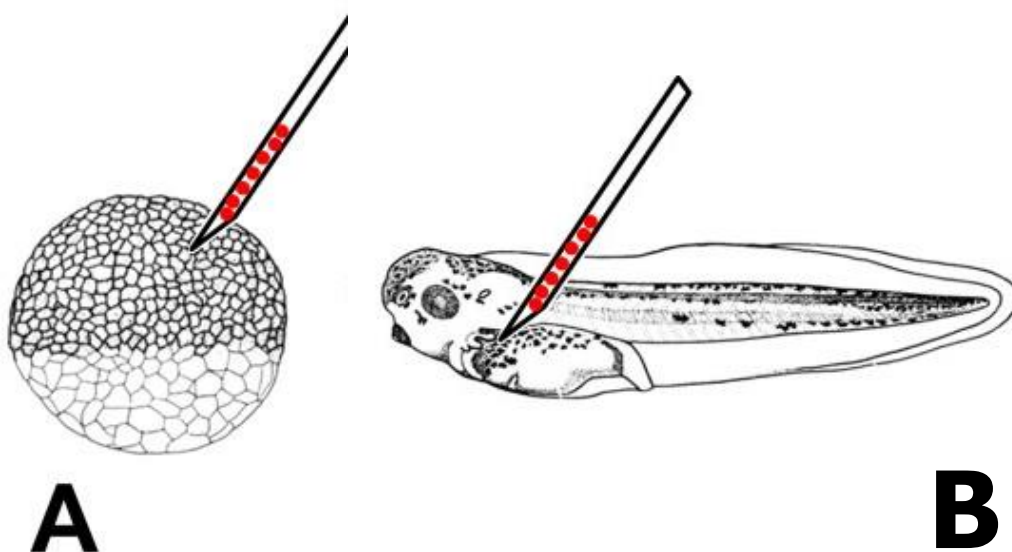
Samice pak byly vykladeny do větší Petriho misky s několika mililitry 1x MMR + Gentamicin. Pro uvolnění spermií byl z varlete vytvořen homogenát v 500 μ l média L15 s 10% FBS, který se přidal k oocytům rozvrstvených po dně misky. Spermie se za krátko navázaly na oocyty. Dvě minuty poté byl do misky přidán roztok 0,05x MMR, který se nechal účinkovat 10 minut a následně byl odstraněn. Oplozené oocyty byly ponořeny do roztoku 2,2% cysteinu. Vzápětí byly oocyty převedeny na misku s agarózou, kde proběhl výběr správně se vyvíjejících zygot a časných embryí (hodnocené znaky: průměr zhruba 1 mm, zřetelně oddělená animální a vegetativní polovina se stejnoměrně zbarvenou cytoplazmou, výskyt tmavší zóny v místě vniknutí spermie). Tato embrya se buď nechala dále vyvíjet nebo byla použita pro transplantační pokusy.

Transplantace

K transplantaci TSCs či podkladových SCs byly použity tenké skleněné kapiláry, jejichž hrot byl upraven těsně před mikroinjekcemi. Aby se s transplantovanými buňkami lépe manipulovalo a bylo zajištěno přesné množství injikovaných buněk, byla suspenze buněk (5 μ l) napipetována na kousek parafilmu a poté nasáta do kapiláry. Buňky byly rozředěny v médiu obsahujícím LIF. Do blastul bylo injikováno 10 nl směsi, jež obsahovalo zpravidla 100 buněk (vypočteno z objemu připravené směsi a změřeného počtu buněk), do embryí ve stádiu 41 (stádium se

určovala podle Nieuwkoop and Faber (1994)) bylo transplantováno 40 nl s 1000 buněk.

Samotná transplantace se uskutečnila v Petriho miskách s agarózou v roztoku Ficollu, aby se zamezilo úniku buněk z vytvořeného vpichu. Při mikroinjekcích pulců bylo do roztoku Ficollu přidáno 10-15 kapek imobilizačního agens (0,2% MS222 v 0,2% NaHCO₃). Tlak v kapiláře byl nastaven na asi 8,5 psi. Injikovaná embrya byla po transplantaci přenesena do nové misky vylité agarózou a s roztokem 0,05x MMR s přidaným Gentamicinem. Schéma provádění vpichu je znázorněno na obrázku 2.



Obrázek 2: Způsoby mikroinjekce. A – blastula, B – dorzální peritoneum

Pozorování mikroinjikovaných embryí *X. tropicalis* a řezových preparátů

Zkoumání řezových preparátů nebo živých embryí (při analýze se pulci uspávali uspávacím roztokem MS-222) probíhala na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX40 (Olympus Optical) a na fluorescenční binolupě Olympus SZX16 (Olympus Optical).

Optimalizace metodiky

Před zavedením protokolu pro novou metodiku byly všechny preparáty fixovány ve formaldehydu. Po vytvoření stálého protokolu k nové metodě se začala embrya

fixovat v MEMFA roztoku, ten by měl být k vzorkům obojživelníků šetrnější. Pokud není řečeno jinak, probíhají všechny pokusy při pokojové teplotě.

Parafinové řezy

Zalévání vzorku do parafínu

Fixování pulci (v roztoku formaldehydu) byli šestkrát promyti kohoutkovou vodou. Poté odvodnění ve vzestupné řadě etanolu (30% -> 50% -> 80%), pokaždé třikrát po 5 minutách pro každou z koncentrací vše při pokojové teplotě. Následovala 5 minut dlouhá inkubace ve 100% etanolu a další dvakrát opakované 10-minutové promývání v benzenu. Potom byly preparáty zality benzoparafínem a ponechány v termostatu při 60°C na 20 minut. Vzorky se pak přesunuly do misky s parafínem a opět vráceny do termostatu při stejné teplotě tentokrát na 1 hodinu. Za hodinu byli pulci umístěny do forem a byla jim upravena poloha a takto zůstali při pokojové teplotě až do druhého dne, kdy se vložili na 30 minut do lednice. Po zchlazení byl ze vzorku připraven bloček na řezání tak, aby samotná tkáň vyplňovala co největší prostor v bločku.

Příprava řezových preparátů na mikrotomu

Z řádně připevněného bločku byly vytvářeny řezy o síle $\approx 8 \mu\text{m}$. Ty byly následně přeneseny na podložní sklíčka vyhřátá na ploténce a pokapána destilovanou vodou, aby se roztáhly.

Kryosekce

Příprava preparátů pomocí kryostatu nezajišťuje většinou takovou kvalitu vytvořených řezů jak je tomu u zálévání do parafínu, je však hodná pro řezání tkání značených vitálními barvičkami.

Jak už bylo zmíněno v úvodu, tkáň je řezána při teplotách okolo -20°C (teplotu je možné přizpůsobit typu vzorku). To zajišťuje situování celého procesu do speciální komory chlazené dusíkem, chlazené je i samotné rameno, na němž je připevněný vzorek. Vedle kryostatu je ploténka, na které se nahřívají podložní sklíčka pro rychlejší přilnavost řezů. Pro kryosekce se vyrábějí speciální sklíčka, která mají upravený povrch, aby na nich preparáty lépe držely. Vzorky se připravují na malých kulatých držácích. Ty jsou zprvu pokryty O.C.T. médiem, jež se nechá zatuhnout, a na něj je

pak položen vzorek, který je zalit stejným médiem. Po ztvrdnutí se opět vytvoří bloček a ten je pak řezán na plátky libovolné velikosti (od cca 5 μm po 300 μm). V tomto případě byly vytvářeny řezy o síle 5-15 μm .

Prosycení preparátů sacharózou a želatinou

Aby se zabránilo vytvoření krystalů vody, byly vzorky prosycovány vzestupnou řadou sacharózy. Pulci byli umístěni do 50ml zkumavek s kónickým dnem, do kterých se roztoky přidávaly i odebíraly pomocí tenké Pasteurovy pipety. Nejprve se vzorek promýval od formaldehydu pětkrát po 3 minutách v 2/3 PBS. Následovala inkubace v 7,5% sacharóze asi 2,5 hodiny (než se pulec ponořil) v lednici. Poté byl vzorek zalit 15% sacharózou a opět uchováván v lednici, po zhruba 2,5 hodinách (zase do ponoření pulce) byla sacharóza odstraněna a přidána 7,5% želatina, v níž vzorek zůstával přes noc (12 hodin) ve vodní lázni ohřáté na 37°C. Další krok zahrnoval zalití 15% želatinou a opět 12-hodinová inkubace ve vodní lázni. Posledním krokem bylo přidání 20% želatiny a následné ponechání vzorku ve vodní lázni po 12 hodin. Prosycení želatinou bylo později zcela vynecháno a nahrazeno inkubací vzorků v 30% sacharóze přes noc.

Takto připravené vzorky byly zastřiženou plastovou pipetou přeneseny do zamrazovacích bločků a pomocí jehly se jim upravilo umístění. Vzorek byl přemístěn do mrazáku nebo rovnou do kryostatu (-20 °C) a čekalo se až sacharóza zatuhne, což trvalo asi 1-2 hodiny. Tyto vzorky nebylo dále nutné zalévat do O.C.T. média. Pomocí média se pouze připevnily k držáku v kryostatu.

Vibratom – příprava řezových preparátů

Řezání vzorků je založeno na pohybu velmi rychle rozvibrované žiletky proti vzorku, který je opět zakryt médiem z něhož je vytvořen bloček. Tento bloček se přichytává na speciální disk například pomocí obyčejného vteřinového lepidla. Disk se vzorkem je poté vložen do vaničky s vyvýšeným podstavcem na dně, kde je disk upevněn díky magnetům jak v disku tak ve vaničce. Do vaničky se poté nalije roztok, nejčastěji 1x PBS. V případě poloautomatického vibratomu (který byl užit v experimentech v rámci této práce) uživatel nastavil polohu žiletky, rychlost pohybu ramena se žiletkou a amplitudu kmitu žiletky zprava doleva. Taktéž se nastavovala i síla řezů nebo poloha celého stolečku se zmíněnou vaničkou. Před řezáním bylo vždy nutné nakalibrovat celý přístroj pomocí VibroChecku.

Pulci byli fixováni v MEMFA roztoku při 4°C přes noc, ale ne déle jak 24 hodin (při pokojové teplotě stačila 2-hodinová fixace). Následovalo několikanásobné promytí ve 100% metanolu. Takto připravené vzorky se mohly uchovávat v mrazáku (-20°C) minimálně rok (avšak aby nevznikaly nežádoucí artefakty, jsme embrya skladovali nejdéle po dobu půl roku). Vzorek v metanolu bylo nutné rehydratovat v sestupné metanolové řadě (90 % -> 75 % -> 50% -> 25 %), kdy metanol byl ředěn roztokem PBST. Poslední v řadě bylo promytí v 1x PBS. Každý krok se opakoval třikrát po dobu 5 minut. Rehydratovaný vzorek byl přenesen do 15ml zkumavky s kónickým dnem obsahující asi 10 ml 3% roztoku agarózy. Zkumavka byla vložena do hybridizační pece vyhřáté na 48°C a ponechán v ní přes noc při mírných otáčkách. Druhý den byl pulec přesunut do 24-jamkové nebo 12-jamkové kultivační destičky tak, aby byl celý zalit v agaróze, a byla mu upravena poloha. Destička byla vložena na 5-10 minut do mrazáku, ze kterého byla následně vyjmuta a přesunuta do lednice, kde se vzorek uchovával do samotného řezání (ne však déle jak 1 den).

Po upevnění preparátu na disk, byla vanička naplněna 1x PBS (raději vychlazeným). Podle typu tkáně v pulci se rychlost pohybu žiletky udržovala mezi 0,18 – 0,3 mm/s a amplituda byla nastavena na 0,45 při síle řezů 30 – 40 µm. Vytvořené řezy se z roztoku přenášely pomocí skleněné trubičky zakončené balónkem buď na sklíčko, nebo do 6-jamkové kultivační destičky. Po výměně použitého PBS za nový roztok mohly řezy být takto uchovávány po dobu jednoho týdne.

Imunohistochemické metody

Aby bylo možné pozorovat zda a jak transplantované buňky migrují a diferencují byla využita metoda imunohistochemického fluorescenčního barvení. Při něm se na zvolenou cílovou molekulu naváže primární protilátka, která buď sama může emitovat světelný signál z konjugovaného fluoroforu, nebo se použije ještě sekundární protilátka s fluoroforem, jenž se váže na protilátku primární.

Parafínové preparáty byly připravovány klasickým způsobem, kdy se řezy deparafinovali a následně obarvily pomocí DAPI, které značí jádra buněk. Kryorezy nebyly nijak obarveny. Pro pozorování bylo využito vlastní fluorescence exprimovaného RFP proteinu v transplantovaných buňkách.

Řezy z vibratomu byly vloženy do 0,1% roztoku Tritonu X-100 ředěného 1x PBS na 1 hodinu. Následovalo promývání v 1x PBS třikrát po 5 minutách. Aby byla

zablokována nespecifická vazebná místa, na která by se mohly navázat protilátky, byly řezy přesunuty do blokovacího roztoku TNB na 1 hodinu. Poté se řezy nechaly inkubovat s roztokem primární protilátky (ředěným na daný poměr roztokem TNB) přes noc při 4°C. Dále se řezy opět promývaly v 1x PBS třikrát po každé 5 minut. Sekundární protilátka se s řezy inkubovala 1,5 hodiny při pokojové teplotě a zakryté, aby se zabránilo vysvícení fluoroforu. Sekundární protilátka se také ředila pomocí roztoku TNB. Po inkubaci se řezy opět promyly 1x PBS třikrát po 5 minutách. Pokud se řezy obarvovaly v kultivační destičce, přenesly se následně na podložní sklíčko. Rozprostřené řezy byly poté potaženy tenkou vrstvou mountovacího média Mowiol s fluorescenční barvou DAPI a zakryty krycím sklíčkem.

Výsledky

Mikroinjekce

Při transplantacích byly RFP-buňky z buněčné kultury juvenilních samců *X. tropicalis* injikovány do embryí a pulců pocházejících z IVF. Mikroinjekce byly aplikovány do peritoneí pulců ve stádiu 41, kterého dosáhne embryo dva dny po oplození. Toto stádium bylo vybráno hned z několika důvodů. Vzhledem k svému mírně zploštělému tvaru bylo snazší do embryí zavádět kapiláry. Zároveň se v tomto stádiu teprve začíná utvářet trávicí soustava, což znamená, že při injekci do peritonea je riziko poškození vyvíjejícího se pulce minimální. V neposlední řadě tato dutina umožňuje RFP buňkách snadný přístup do ostatních částí těla, kam následně migrují.

Do peritonea se zavádělo 40 nl suspenze buněk, tedy 1000 buněk na jednoho pulce. Na obrázku 3 je pulec den po transplantaci RFP buněk. Pulci byli poté fixováni ve stádiích 41, 45, 48, 52, což odpovídá stáří dvou dnů, pěti dnů, jednoho týdne a jednoho měsíce.

Optimalizace metodiky přípravy řezových preparátů

V rámci optimalizace přípravy řezových preparátů jsem postupně otestovala tři přístupy: 1) zalití preparátu do parafínu s následným řezáním na mikrotomu, 2) kryosekci a 3) řezání agarózou zalitého preparátu na vibratomu.

Mikrotom (data nezveřejněna)

Jako první jsme zkusili techniku přípravy řezových preparátů pomocí mikrotomu, tedy přípravu parafínových řezů. Tato data bohužel nejsou k dispozici, protože výsledky byly na stejné úrovni nebo horší než v předchozích pokusech prováděných v laboratoři.

Domnívali jsme se, že problém s vypadáváním kusů tkáně z řezů je způsoben špatnou přilnavostí preparátu ke sklíčku. Proto jsme zkusili použít různé typy sklíček nebo upravit jejich povrch. V prvním experimentu jsme zkoušeli 4 typy: sklíčka určená pro kryorezy, sklíčka ošetřena 2% roztokem APTS (γ -aminopropyltriethoxysilan), sklíčka pokrytá 1,5% želatinou a sklíčka s 1,5% želatinou s přídavkem $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$. Došli jsme k závěru, že nejlepších výsledků jsem dosáhl s oběma roztoky želatiny. Na druhou stranu se nám nepodařilo úplně odstranit problémy s vypadáváním částí tkání

a byli jsme nuceni otestovat další metody přípravy řezových preparátů. Zaměřili jsme se proto na přípravu preparátů pomocí kryostatu.

Kryořezy

Metodika vycházela z postupů, které v laboratoři zavedla Helena Fuxová, který spočíval v prosycování fixovaných pulců roztoky sacharózy a želatiny. Tento postup byl zdlouhavý a nedosahovali jsme uspokojivých výsledků. Části tkání i nadále z řezů vypadávaly, a proto jsme se ho rozhodli upravit. Inkubaci v želatině jsme nahradili dalším roztokem sacharózy, který byl dvakrát koncentrovanější než ten předchozí. Postup zahrnoval inkubaci v 7,5% sacharóze asi 2,5 hodiny (než se pulec ponořil) v lednici. Následně byl vzorek zalit 15% sacharózou a opět uchováván v lednici, než se pulec ponořil (tedy zhruba 2,5 hodiny). Jako poslední se pulec nechal prosytit 30% sacharózou v lednici přes noc. Následující den byla embrya zastřiženou plastovou pipetou přenesena do zamrazovacích bločků, které byly uloženy do mrazáku nebo rovnou do kryostatu (-20 °C). Po jejich zatuhnutí (1-2 hodiny) byly vzorky upevněny na držák kryostatu a řezány na 5-10 mikrometrové řezy.

Nejlepší výsledky jsou znázorněny na obrázku 4. Tato technika nám umožňovala vytvořit řezy bez ztráty tkání. Během zdokonalování této metody jsem zjistila, že každé stádium vyžaduje jinou teplotu. Tedy čím starší embryo/pulec byl, tím nižší teplota objektu (držáku se vzorkem) v komoře kryostatu se musela nastavit. Problém však byl v rozeznávání morfologie tkání a typů buněk. Mohli jsme pozorovat, zda naše buňky v pulci jsou, ale nevěděli jsme, ve které konkrétní části těla se nachází, nebo jestli se mění jejich morfologie. Zároveň bylo těžké zajistit, aby při každém řezání vznikl preparát vhodný k pozorování.

Z hlediska zkoumání dalšího vývoje pulců a mikroinjikovaných buněk jsme potřebovali dokázat připravit i preparáty ze starších pulců (starších než 1 týden po oplození), což se ukázalo jako velký problém, pokud jsme na jejich přípravu použili kryostat.

Vibratom

V prvních experimentech, jsme užívali zalévací médium, které obsahovalo albumin a pro zatvrdnutí bylo nutné používat glutaraldehyd. Albumin lépe interagoval

s lipidy na povrchu embryí a glutaraldehyd umožnil prosítování ostatních molekul v roztoku. Na obrázku 5 jsou velmi zřetelné struktury srdce i neurální trubice.

Na základě pozitivních výsledků jsme začali vyhledávat protokoly pro přípravu řezových preparátů na vibratomu. Nejvíce jsme se nechali inspirovat studií od Blackistona et al. (2010). Jejich metoda byla založena na zalévání vzorku do low melting point agarózy (LMA) a fixací roztokem MEMFA.

Z důvodu vyšších pořizovacích nákladů na low melting agarózu postup přípravy preparátu pro vibratom jsme optimalizovali s použitím běžně dostupné agarózy pro elektroforézy. Jednokrokový proces zalévání do 4% agarózy jsme rozdělili na dvoukrokový. Napřed proběhlo prosycení sacharózou postupně od 7,5% přes 15% až na 30%, z níž byl pulec převeden do 5% agarózy, ve které se nechal zatuhnout. Poměrně často však docházelo k vypadávání částí tkání ze zatuhlé agarózy. Proto jsme se rozhodli, vynechat krok s prosycováním vzorků v sacharóze a nahradit ho inkubací v 1% agaróze přes noc při 37 °C, která se díky nižší hustotě mohla lépe dostat do dutin pulce a vyplnit je. Druhý den byl vzorek přenesen do čisté kultivační destičky a zalit 5% agarózou, v níž se nechal zatuhnout. S tímto postupem jsme měli větší úspěšnost, na obrázku 6 je řez z embrya ve stádiu 26 (oblast žloutkového vaku – budoucího střeva) a na obrázku 7 je pulec ve stádiu 41 (průřez hlavou – patrné struktury obou očí). Ale přesto bylo těžké predikovat, zda bude řezání spolehlivé. Nebylo výjimkou, že se vzorky při řezání rozpadaly, protože nevydržely nápor vibrující žiletky. Především starší stadia, která obsahují více dutin byla velice choulostivá a často se trhala.

Rozhodli jsme se tehdy vyzkoušet inkubaci v 3% agaróze přes noc bez následného přenesení do koncentrovanějšího roztoku. Takto koncentrovaná agaróza nesla výhody obou předchozích. Byla natolik hustá, aby tvořila podporu tkáni při řezání a zároveň dostatečně tekutá, což umožňovalo lepší prostoupení vzorku a vyplnění dutin. Toto spolu se zdokonalením samotného procesu řezání nám umožnilo připravovat řezové preparáty i ze starších pulců, jako na obrázku 8, kde je průřez tělem pulce starého 1 měsíc.

Imunobarvení

Po úspěšném zavedení metody přípravy řezových preparátů následovalo imunologické značení. Protože jsme ověřovali hypotézu, že naše buňky mají

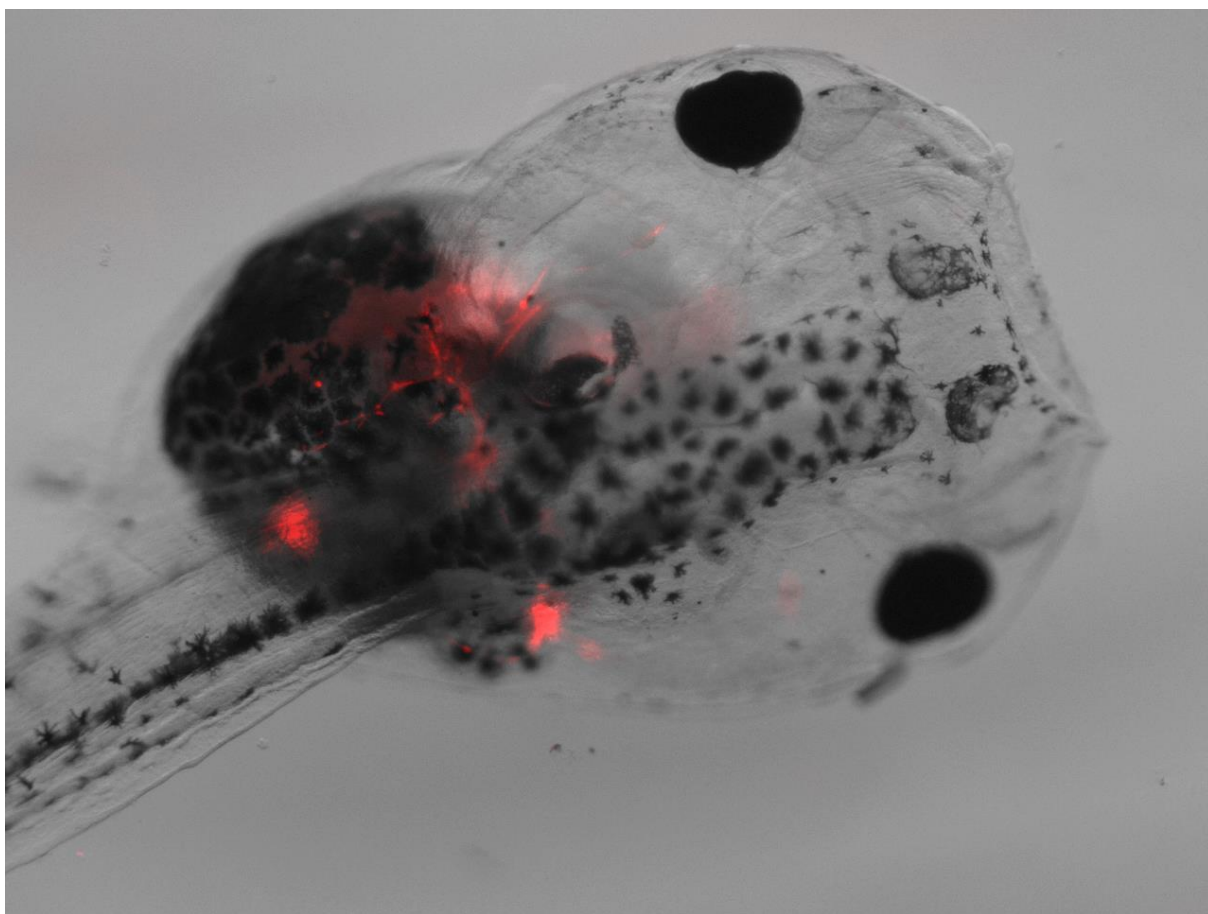
mesenchymální charakter a navíc se nám zdálo, že vytváří neuronům podobné struktury, začali jsme postupně zkoumat, zda transplantedované buňky obsahují markery typické pro jednotlivé druhy buněk. První značení pomocí protilátky ZN-12, která se váže na neurální povrchový marker, se zprvu jevílo pozitivně, ale při pozorování konfokálním mikroskopem jsme zjistili, že buňky pouze kopírují linii nervových vláken (obrázek 9).

Jako další jsme použili protilátky: D7F2 značící kosterní svalstvo, 1E12 proti actininu pro zvýrazněný hladké svaloviny, TBX20 vážící se na progenitory kardiomyocytů. U všech jsme dosáhli neúspěchu, jak je patrné z obrázků 10 a 11.

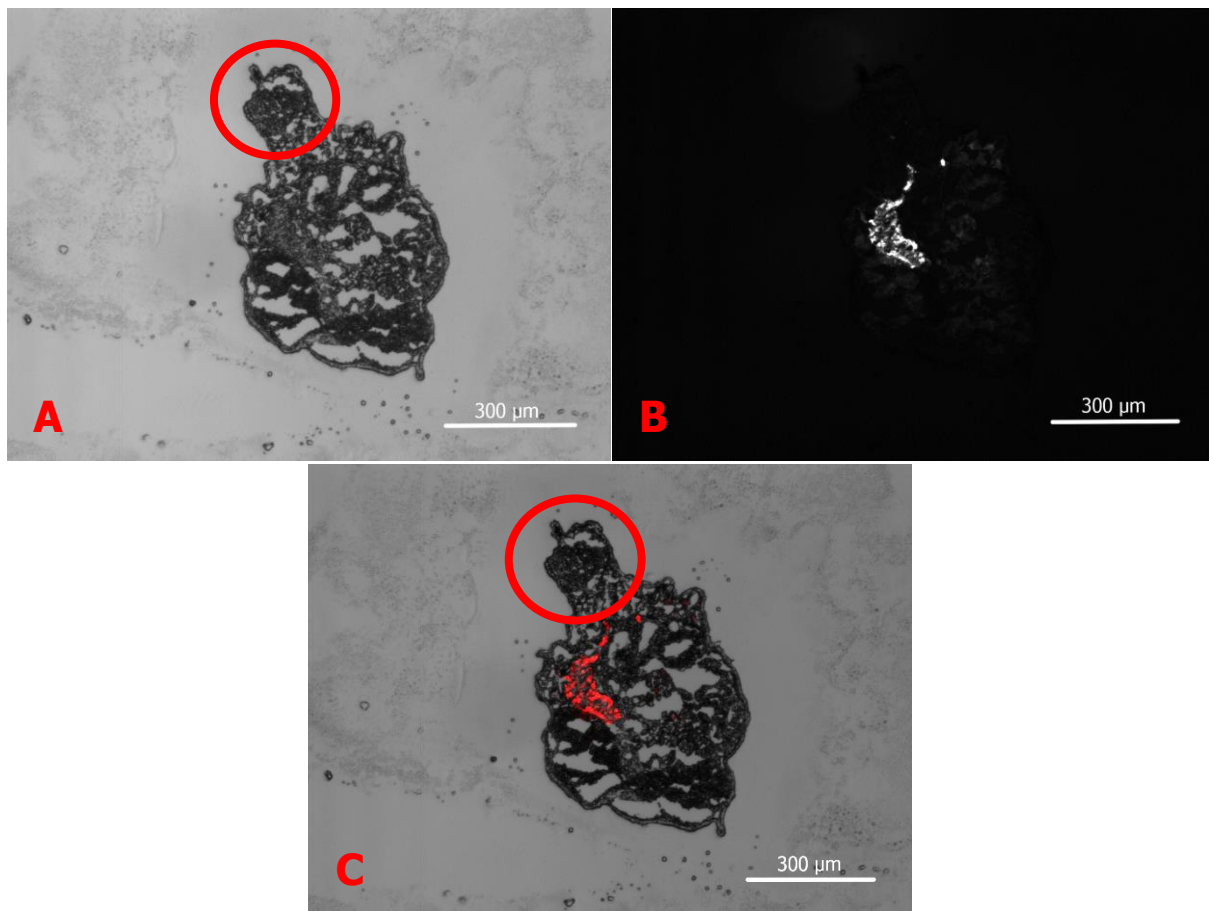
Protože transplantedované buňky pocházejí z buněčné kultury vytvořené z varlat rozhodli jsme se pro značení buněk proti vimentinu (protilátka 14h7) jakožto markeru Sertoliho buněk a také buněk migrujících, proti SOX9 (marker testikulárních buněk) a α -actinu z hladké svaloviny (marker myoidních buněk - Sma). Obrázek 12 ukazuje silnou expresi vimentinu v transplantedovaných buňkách. Na obrázku 13 je vidět velmi slabý až žádný kolokalizační signál z transplantedovaných RFP buněk a protilátky proti SOX9. Při značení α -actinu jsme dosáhli podobných výsledků jako při použití anti-SOX9, signály se téměř nepřekrývají (obrázek 14).

Všechny tyto pokusy potvrdily hypotézu, že buněčná kultura vytvořená v laboratoři školitele obsahuje progenitory Sertoliho a PTMC buněk se sklonem k diferenciaci do Sertoliho buněk. Buňky po transplantaci do embrya jsou schopné migrovat do všech částí těla, ale nedokáží se diferencovat v jiný buněčný typ a zachovávají si svůj původní charakter.

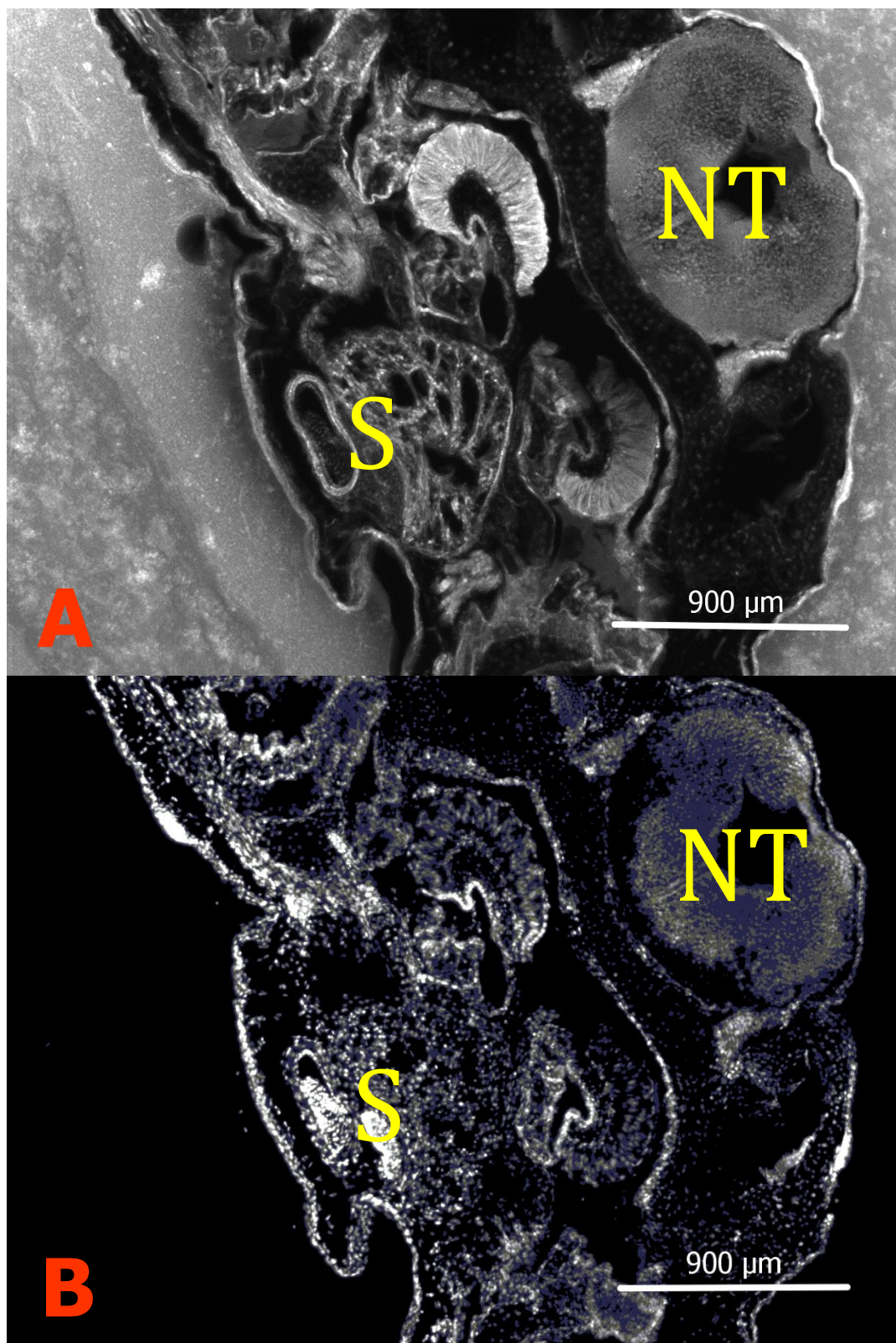
Výsledky – obrazová dokumentace



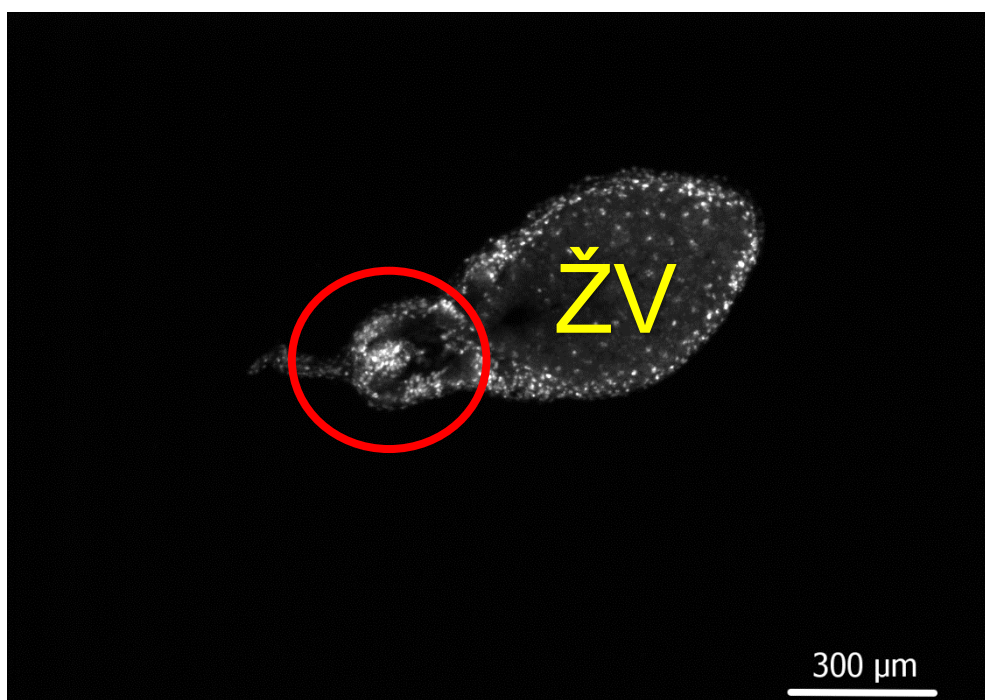
Obrázek 3: Mikroinjikovaný pulec - stádium 48. RFP buňky znázorněny červeně.



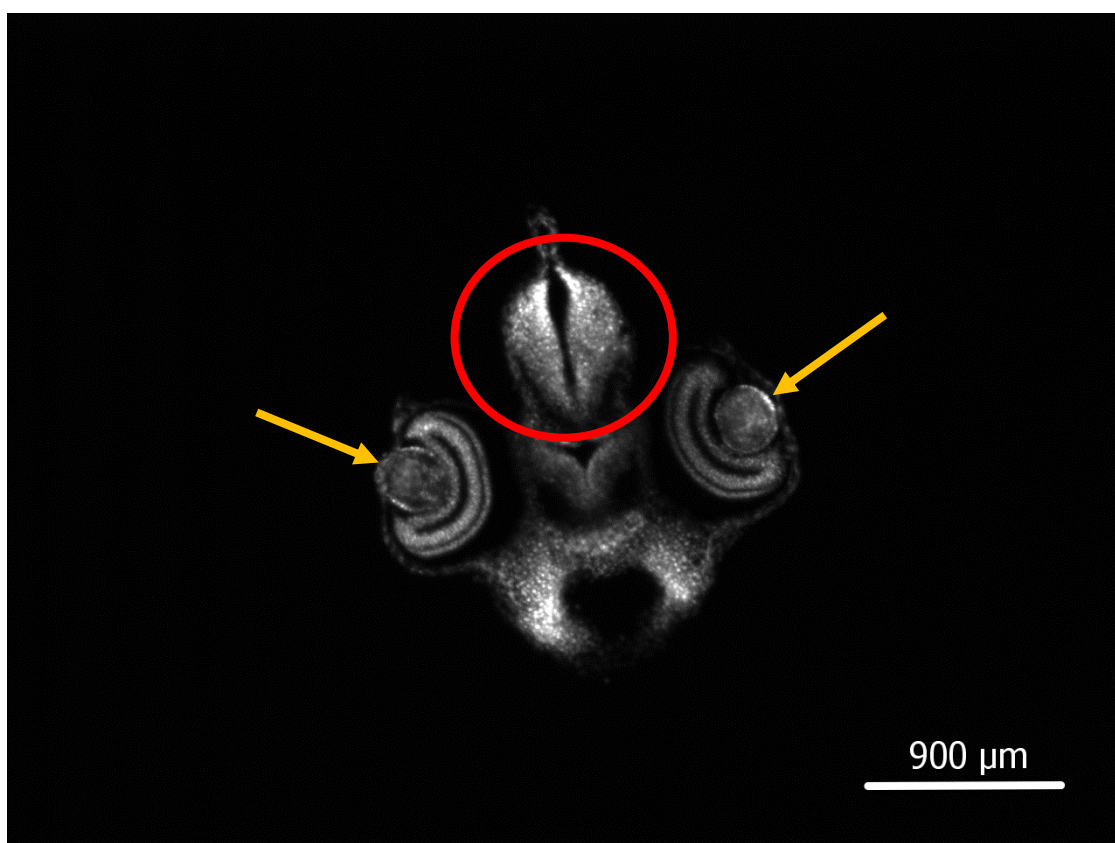
Obrázek 4: Kryořez mikroinjikovaného pulce – stádium 46. V kroužku neurální trubice a pod ní střeva pulce. A: Foceno pod světlem; B: Fluorescence buněk označených RFP; C: Spojení předchozích snímků



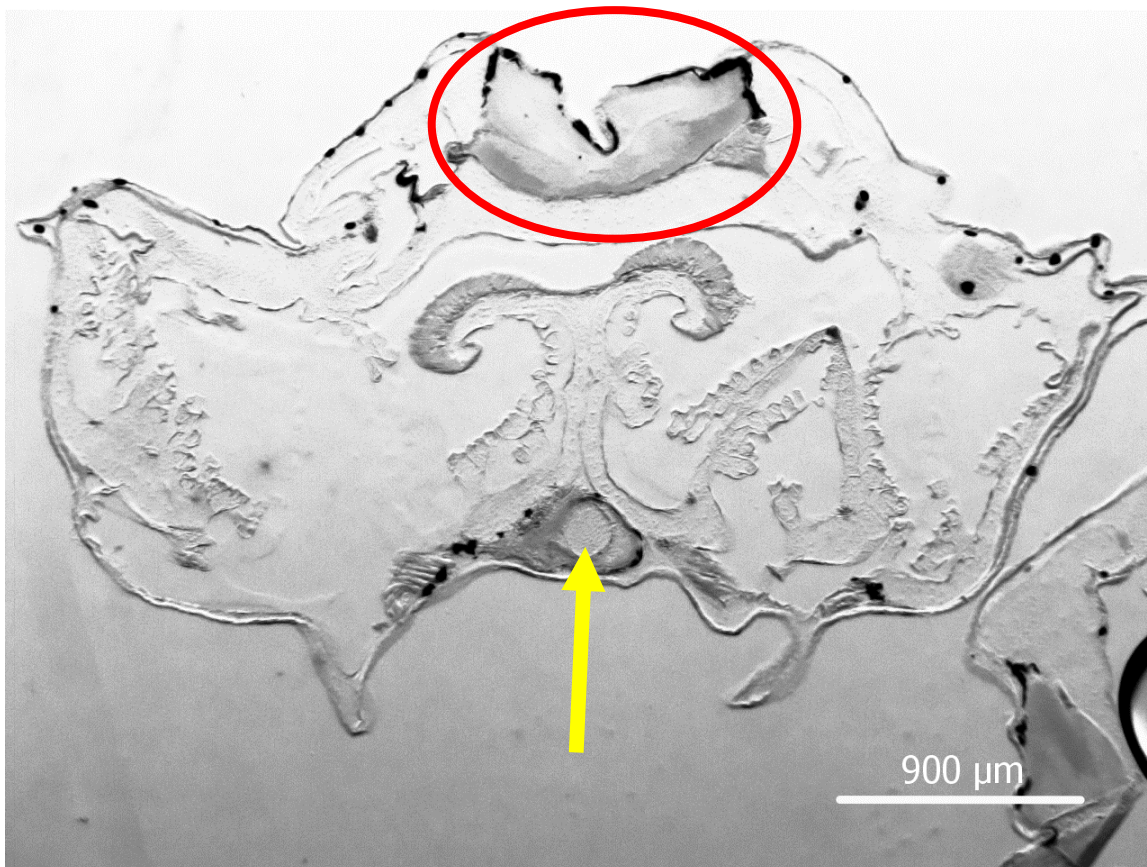
Obrázek 5: Vibratomový řez pulce - stadium 48, zálevací medium s albuminem smíšené s glutaraldehydem. A – autofluorescence řezu, B – jádra buněk obarvena DAPI; NT – neurální trubice, S - srdce



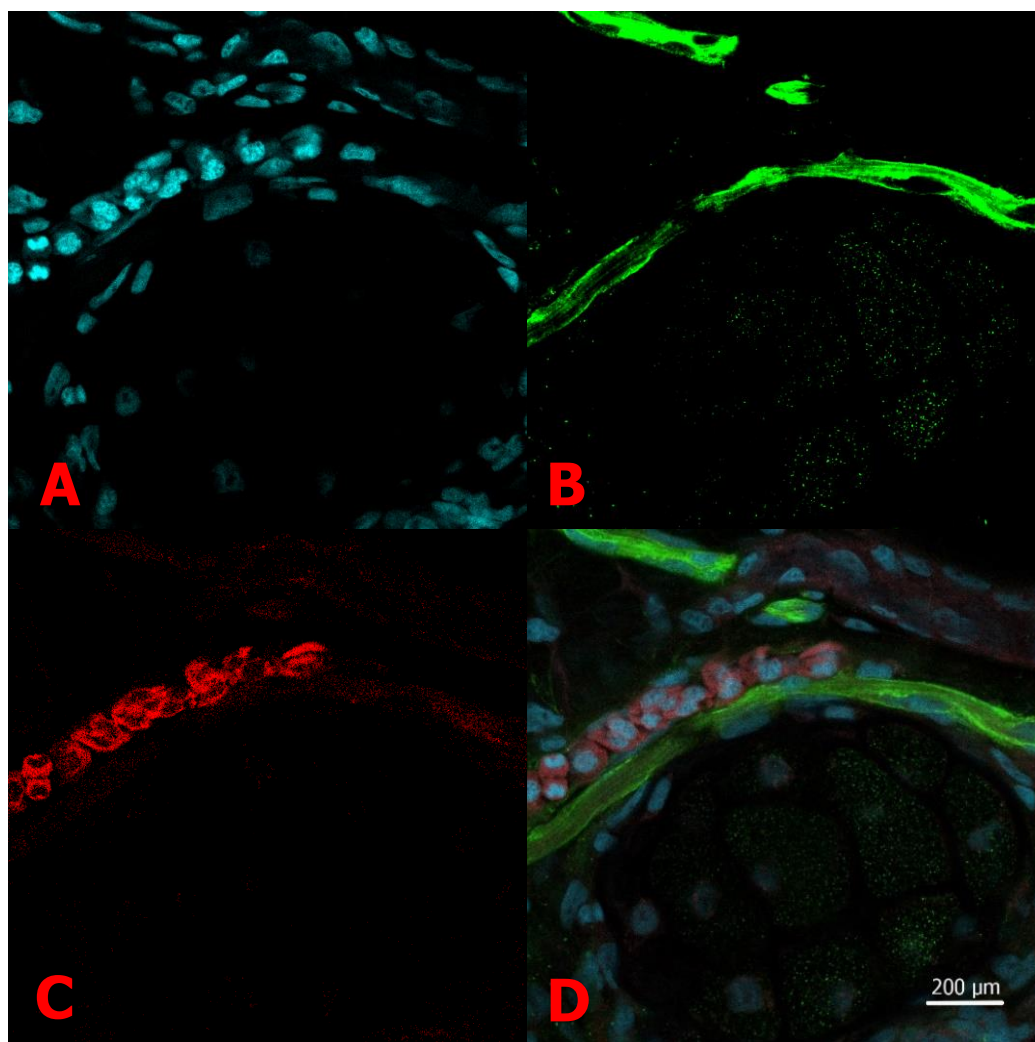
Obrázek 7: Vibratomový řez embryem - stádium 26, inkubace v 1% agaróze a poté v 5% agaróze. Jádra buněk barvena pomocí DAPI; v kroužku se nachází neurální trubice, ŽV - žloutkový váček



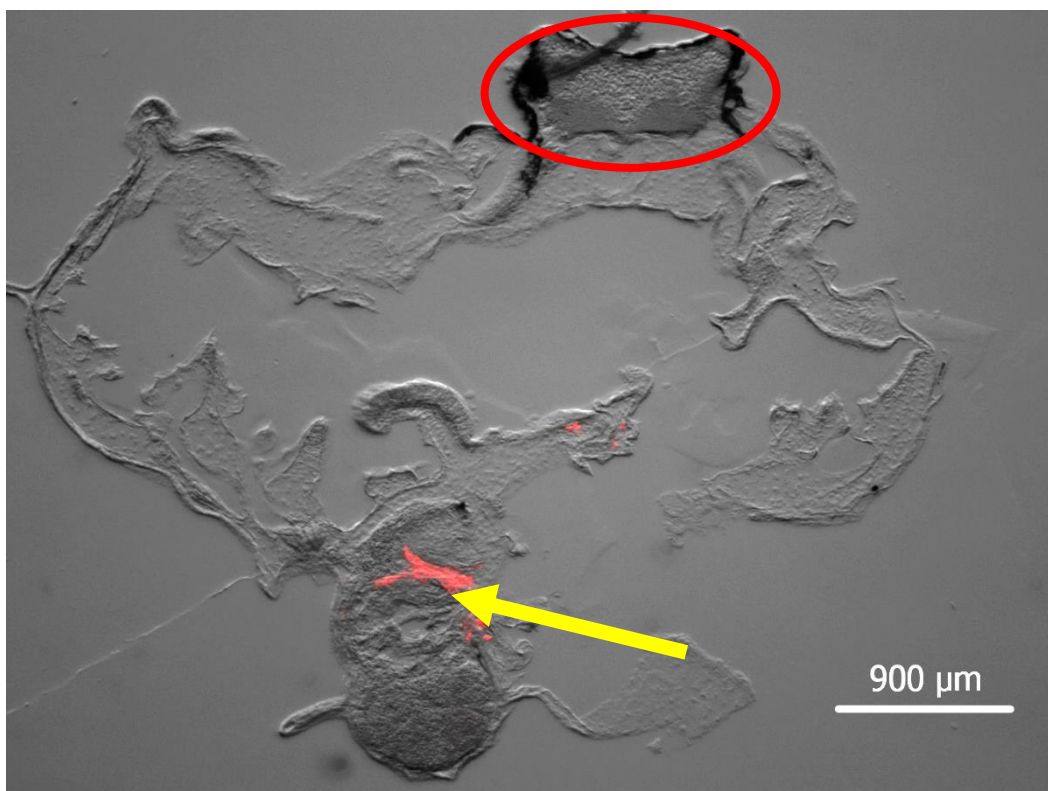
Obrázek 6: Vibratomový řez pulcem - stádium 41, inkubace v 1% agaróze a poté v 5% agaróze.: Jádra buněk obarvena pomocí DAPI; v kroužku je znázorněna neurální trubice, šípky označují oči



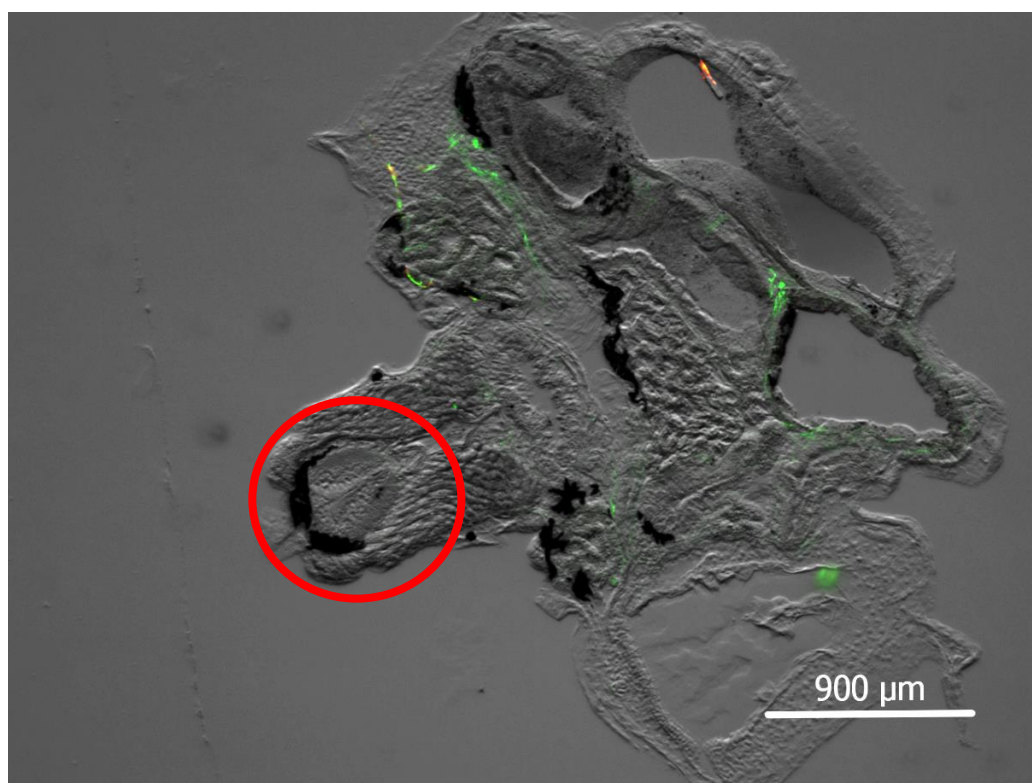
Obrázek 8: Vibratomový řez-pulce starého 1 měsíc, inkubace v 3% agaróze.. V kroužku je neurální trubice a šipkou označeno srdce.



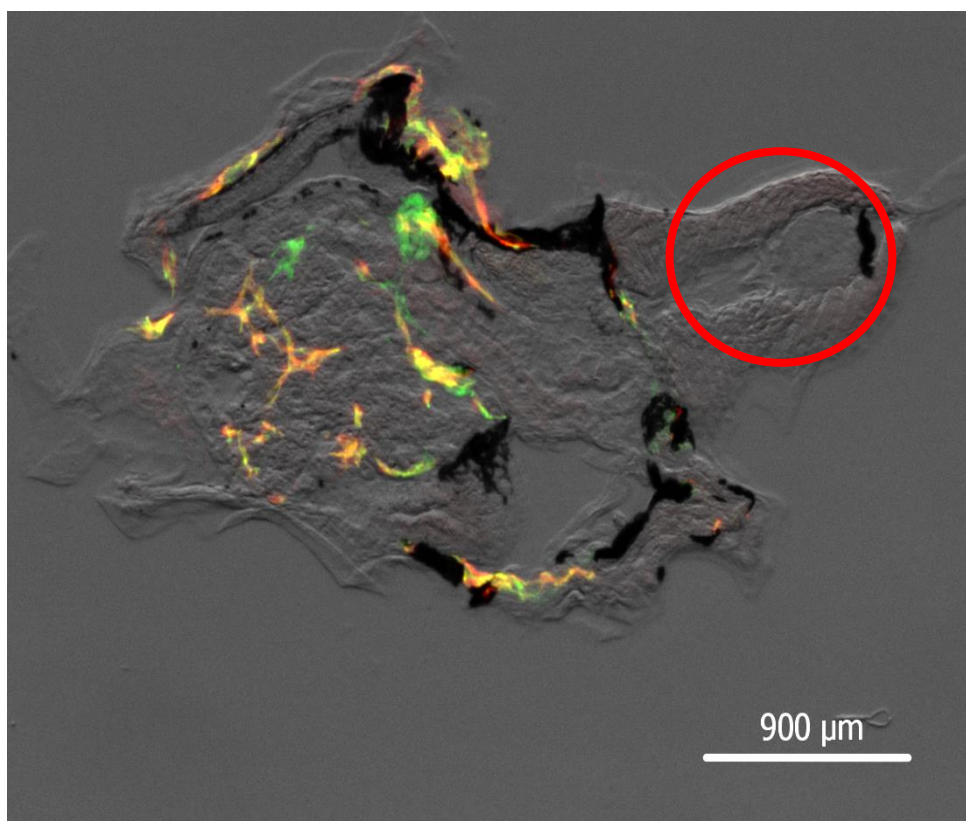
Obrázek 9 Vibratomový řez mikroinjikovaného pulce, 1 měsíc po IVF, značení protilátkou ZN-12. A – jádra buněk obarvena DAPI; B – fluorescence RFP v buňkách, C – obarvené neurony primární protilátkou ZN 12 a sekundární protilátkou; D – spojení předchozích obrázků (snímek pořízen konfokálním mikroskopem, měřítko 200 μm)



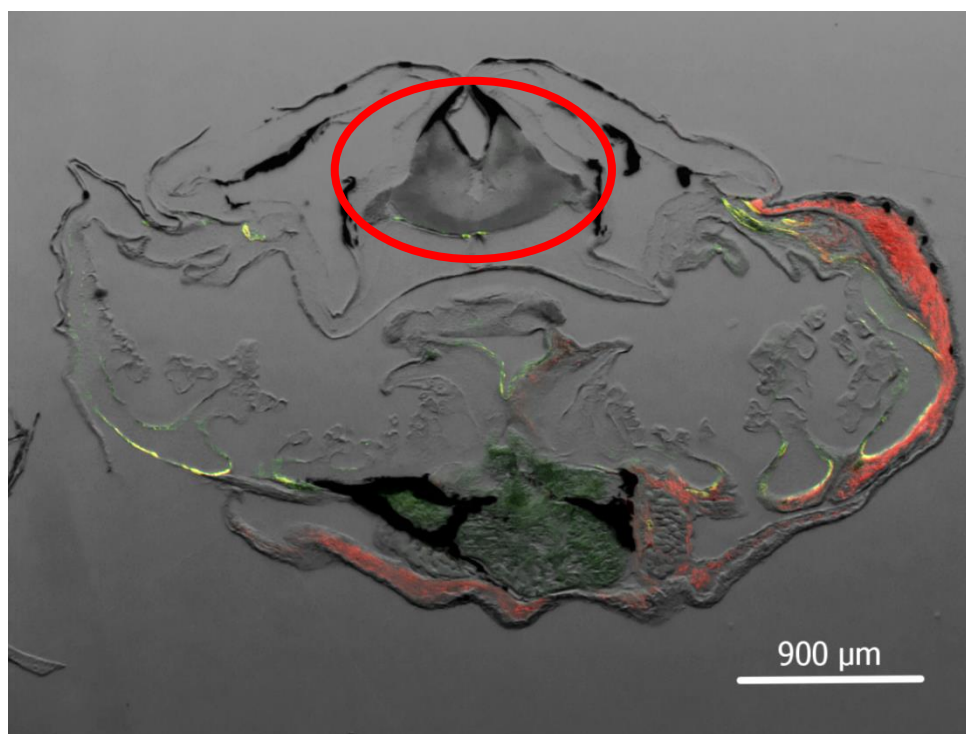
Obrázek 10: Vibratomový řez mikroinjikovaného pulce, 1 měsíc po IVF, značení protilátkou D7F2. Řez v oblasti srdce. Červeně označené RFP buňky, interakce protilátky D7F2, která je značena zelně, s buňkami není vidět. V kroužku je neurální trubice a šipkou označeno srdce.



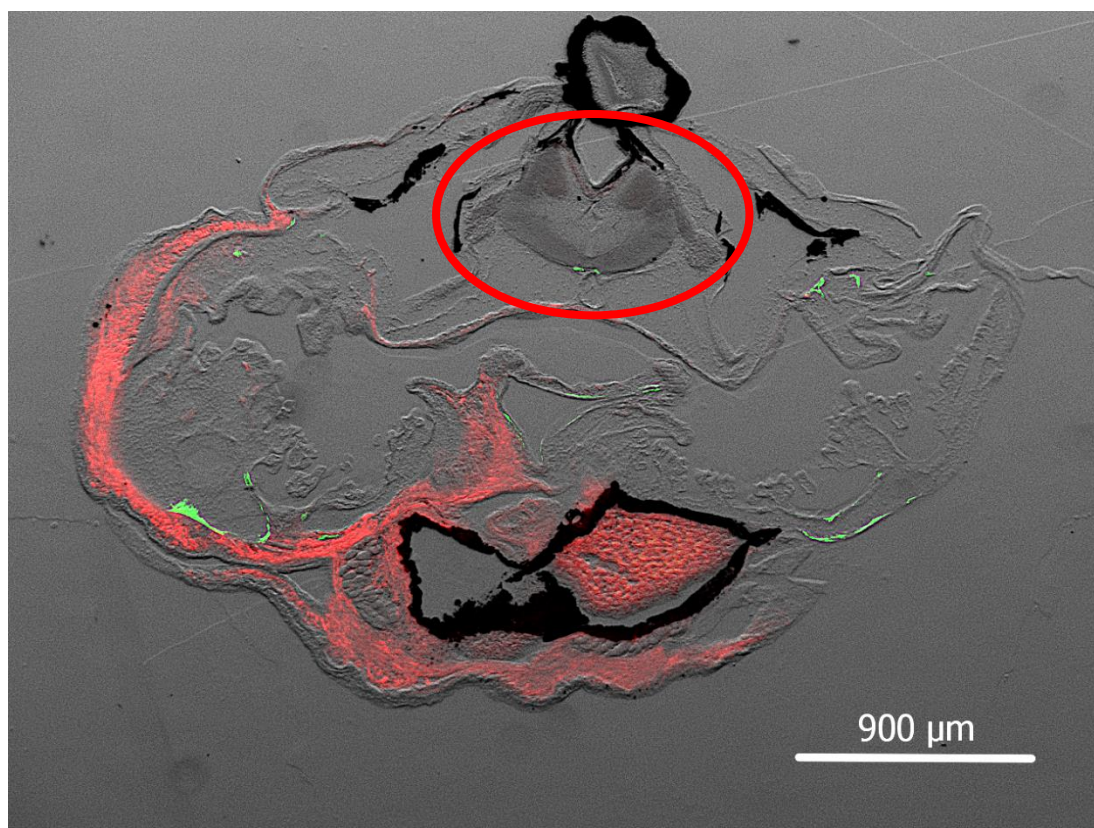
Obrázek 11: Vibratomový řez mikroinjikovaného pulce, 1 měsíc po IVF, značení protilátkou 1E12. Řez v oblasti střeva. Červeně značené jsou RFP buňky a zeleně buňky s navázanou protilátkou 1E12. V kroužku je neurální trubice.



Obrázek 13: Vibratomový řez mikroinjikovaného pulce, 1 měsíc po IVF, značení protilátkou 14h7. Zeleně značený vimentin, červeně označené transplantované buňky, žlutá je výsledek kolokalizace; v kroužku je neurální trubice



Obrázek 12: Vibratomový řez mikroinjikovaného pulce, 1 měsíc po IVF, značení protilátkou anti-SOX9. Zeleně jsou označeny buňky exprimující SOX9, červeně transplantované buňky, žlutá znamená koexpresi SOX9 a RFP; v kroužku je neurální trubice.



Obrázek 14: Vibratomový řez mikroinjikovaného pulce, 1 měsíc po IVF, značení protilátkou anti-SMA.: Zeleně jsou označeny buňky exprimující Sma, červeně transplantované buňky; v kroužku je neurální trubice

Diskuze

Během vypracovávání této diplomové práce byl vyvinut nový postup pro přípravu řezových preparátů mikroinjikovaných embryí modelového organismu *Xenopus tropicalis*.

Xenopus tropicalis (drápatka tropická) se řadí do třídy obojživelníků, kteří tráví celý svůj život ve vodě. Vývoj embrya těchto žab probíhá mimo tělo matky, která klade neoplozené oocyty do vody a čeká až je samec oplodní. V laboratorních podmínkách je toto řízeno v technice zvané IVF. Toto spolu s rychlým vývojovým cyklem jedince činí žáby z rodu *Xenopus* vynikajícími organismy pro studium vývojové biologie. (Harland and Grainger, 2011)

Do pulců byla mikroinjikována suspenze transformovaných buněk, které v sobě nesou gen pro fluorescenční protein RFP. Buněčná kultura s těmito modifikovanými buňkami byla založená z varlat juvenilních samců drápatky tropické v laboratoři vedoucího práce. *In vitro* tyto buňky vykazovaly charakter mesenchymálních kmenových buněk a zároveň exprimovaly markery buněk Sertoliho. Cílem této práce tedy bylo nejen vytvořit stabilní protokol pro přípravu řezových preparátů, ale také zkoumat diferenciační potenciál těchto buněk po transplantaci do žabího embrya.

Jako první jsme zkusili běžně využívanou metodu zalévání vzorků do parafínu. Butler et al. (2001) použili stejnou metodu pro přípravu řezů určených k detekci specifických messenger RNA. Ačkoli řezy vypadaly na první pohled bezvadně, při imunobarvení se části tkání vždy odplavily. Domnívám se, že kdybychom se zaměřili více na hledání kompatibilního roztoku k ošetření povrchu sklíček, dosáhli bychom úspěchu i s parafínovými řezy. Například ve studii od Matsui et al. (2015) se zaměřili přímo na testování speciálních roztoků na překrytí povrchu sklíček tak, aby tkáň nebyla při dalších pokusech odplavena. Nicméně při hledání vhodné látky, jsme nacházeli stále větší množství studií, kde místo parafínových řezů připravovali preparáty pomocí kryostatu.

Kryosekce patří mezi významné techniky používané k přípravě řezových preparátů odvozených z pulců a dospělců drápatek. Ačkoliv je mnoho studií, kde s úspěchem tuto metodu využili, nám se neosvědčila. Příkladem úspěšného využití může být práce z roku 2015, kdy pomocí kryostatu byly připraveny řezové preparáty pro zkoumání fotoreceptorů sítnice transgenního modelu *X. laevis* pomocí transmisního elektronového mikroskopu (Tam et al., 2015). Zpětně soudím, že zásadní

chybou mohlo být zdlouhavé několikanásobné prosycování embryí v roztocích sacharózy a želatiny. Domnívám se, že při výměně méně koncentrovaných roztoků za koncentrovanější, nedocházelo k dostatečnému prostoupení těla pulce druhým roztokem, čímž při zamrazování mohlo docházet k vytváření krystalků vody při zamrazování a tím k poničení nebo až roztrhání tkáně, následkem čehož části tkání špatně držely na podložních sklíčkách a odplavovaly se. Je pravdou, že potopení pulce na dno, mělo značit jeho kompletní prosycení, avšak zda k celkovému prosycení došlo, není jisté. Je také možné, že poškození tkání krystalky vody zhoršilo jejich výslednou kvalitu při pozorování. Důkazem mohou být studie Satoda et al., 1995 a Gravagna et al., 2008 a naše vlastní experimenty, ve kterých je patrné, že nejlepší pro vzorek je, když se inkubuje pouze v jednom roztoku o určité koncentraci. Dokonce se zdá býti podstatné i stáří vzorku. V práci Dubaissi and Papalopulu (2011) autoři používali pro zalévání embryí vždy jinak koncentrovaný roztok rybí želatiny (fish gelatin) v závislost na stupni vývoje zárodků. I přes neúspěch s jsme zjistili, že při řezání vzorků je nutné nastavit teplotu komory i objektu podle toho, jaké stádium pulce řežeme. Starší jedinci potřebovali nižší teplotu než mladší stádia.

Při vytváření řezových preparátů pomocí vibratomu jsme zprvu používali zálevací médium obsahující albumin, ke kterému se poté přidával glutaraldehyd. I v jiných vědeckých pracích využívají médium o podobném složení (Lau et al. 2017 a Ulmer et al., 2017). Vzhledem k tomu, že glutaraldehyd je vysoce toxický a postup přípravy těchto preparátů byl náročný, rozhodli jsme se vyzkoušet netoxickou variantu s použitím agarózy, která nebyla zároveň tolik nákladná. Hlavní inspirací nám byl článek od Blackinton et al (2010). Při metodě s vibratomem se nám více než u jiných metod ukázalo, že problém nemusí být jen v pulci jako takovém, nýbrž i se specifickými částmi těla. U všech metod byla nejkritičtější oblast vyvíjejícího se střeva. Je to velká dutina, která se špatně prosycuje, proto i při řezání bylo nutné břišní části upravit parametry kmitající žiletky, aby se vzorek neponičil. Ve špatně prosycených vzorcích kmitající žiletka vytrhávala kusy tkání z pulčích těl.

Na základě výsledků, kterých jsme dosáhli během výzkumu, je zřejmé, že modifikované buňky obsažené v buněčné kultuře vytvořené z varlat juvenilních samců *X. tropicalis* jsou progenitory Sertoliho a PTM buněk. Zdá se také, že tyto buňky už nastoupily na diferenciací dráhu směřující k Sertoliho buňkám. Potvrzuje to fakt, že po transplantacích do těl pulců, jsou tyto buňky schopné migrovat do všech částí těla, ale nedokáží se vyvinout v jiný buněčný typ.

Buňky byly mikroinjikovány do peritoneální dutiny pulců ve stádiu 41. Během prvního týdne bylo možné buňky pozorovat v oku, srdci nebo ve střevech. Silná exprese vimentinu potvrzuje, že se jedná o druh Sertoliho buněk (Franke et al., 1979) a je také typická pro migrující mesenchymální buňky (Kim et al., 2014). Snížená až žádná exprese diferenciací marker Sertoli a PTM buněk (Sox9 a Sma) značí dediferenciací dráhu směřující k mesenchymálním kmenovým buňkám, které jsou schopny putovat celým tělem a množit se.

Proti této hypotéze může být objev studie od Cool et al. (2008), ve které zjistili, že jediné endotheliální buňky jsou migrujícím typem buněk odpovědným za epitelizaci testikulární sítě kanálků. Ostatní buňky jako například PTM buňky, ale i jiné vznikají z intersticiálních linií uvnitř gonád. Zjistili také, že Sma, klasický marker dospělých PTM buněk je hojně exprimován v raných embryonálních stádiích. Není tedy jasné, zda můžeme použít Sma jako specifický marker, když ho exprimují skoro všechny buňky na počátku vývoje varlete. Nicméně je nutné podotknout, že tato studie pracovala s myším modelem. Bylo by však zajímavé v následujících experimentech ověřit, zda modifikované buňky nenesou také markery endotheliálních buněk.

V jiné studii Magnanti et al. (2001) studovali expresi erythropoetinu (EPO) v primárních kulturách Sertoliho, Leydigových a PTM buněk. Po stimulaci se objevila zvýšená exprese mRNA pro EPO jak v Sertoliho tak v PTM buňkách. Na druhou stranu v Leydigových buňkách nedošlo k žádné změně. Zároveň při inkubaci s folikuly stimulujícím hormonem došlo k navýšení hladiny mRNA pro EPO u Sertoliho buněk, zatímco při stimulaci PTM buněk testosteronem došlo ke snížení hladiny mRNA. Tento fakt by mohl podpořit naši hypotézu, že oba typy buněk jak Sertoliho tak PTM mají stejný prekursor, při čemž při vývoji jednotlivých linií si rozdělily „úkoly“ pro zajišťování homeostázy uvnitř varlat. S trochou nadsázky bych to přirovnala paralogům, genům vzniklým duplikací ze stejného předka, ale oba mají jinou funkci. Přesto je však zajímavé, že pokud obnova těchto buněk probíhá z jednoho prekursoru, tak se každý z obou typů buněk nachází na jiné straně bazální membrány.

Dalším důkazem, že linie mesenchymální i epiteliální může mít společný prekursor je článek od Conigliaro et al. (2013). Ve svém výzkumu se zaměřili na buňky jater. Vytvořili linii residentních jaterních kmenových buněk (RLSC model), který byl schopný spontánně diferencovat do hepatocytů. *In vitro* byly tyto buňky schopné diferencovat do populace, které exprimovaly buď mesenchymální nebo epiteliální geny. Aby objasnili jejich diferenciační kapacitu *in vivo* transplantovali tyto buňky do jater novorozenech myší, kde pozorovali jejich vývoj jak do mesenchymální tak do epiteliální větve. Diferenciace těchto buněk však záležela na specifitě jaterních signálů, zda tyto buňky nastoupily do linií vyhraněných pro játra. Někdo by ale také mohl namítnout, že v játrech se nevyskytuje bazální membrána jako v sementálních kanálcích varlete, která by mohla být překážkou při vývoji a obnově Sertoliho a PTM buněk z jednoho společného prekursoru.

Podle studie od Schlatt et al. (1993) je vývoj PTM buněk v těle jedince podmíněn hormonální stimulací testosteronem a FSH. Zároveň je nezbytná parakrynní komunikace mezi Sertoliho a PTM buňkami. Proto by v dalším výzkumu měla být věnována pozornost možné diferenciaci našich modifikovaných buněk v PTM buňky pomocí hormonální stimulace a dokázat, zda se skutečně jedná o buněčnou kulturu prekursoru společného pro oba typy buněk.

V laboratoři školitele bylo zjištěno (nepublikovaná data), že modifikované buňky jsou schopny diferencovat *in vitro* do chondrocytů, což by naznačovalo jejich mesenchymální charakter. Podle studie od Gong et al. (2017) jsou Sertoliho buňky skutečně jedním z typů mesenchymálních kmenových buněk. Nejen že mají v organismu podobné funkce (modulace imunitního systému, produkce růstových faktorů atd.) zároveň také exprimují skoro stejné povrchové markery. Zjistili také, že Sertoliho buňky jsou schopné proliferovat a diferencovat do osteoblastů a adipocytů, i když oproti MSC je jejich diferenciační potenciál slabší. Vše tedy nasvědčuje tomu, že se opravdu jedná o typ MSC, který už začal diferencovat.

Dlouhodobým cílem výzkumu těchto buněk je získat pluripotentní buňky které by byly schopné diferencovat do všech buněčných typů. V rámci studia jejich diferenciačního potenciálu proběhlo i několik experimentů s transplantací modifikovaných buněk do BALB myší (data nepublikována). Při těchto pokusech bylo zjištěno, že buňky v tělech myší přežívají a dokonce se i množí aniž by měly negativní vliv na kvalitu života mikroinjikované myši. Domnívám se, že to bylo umožněno na základě jejich imunomodulačních vlastností a faktu, že *X. tropicalis* je jediným druhem

z rodu *Xenopus*, který je diploid. V roce 2010 byl osekvenován genom drápatky tropické (Hellsten et al., 2010). *X. tropicalis* je savcům podobná z hlediska genomu, vývoje orgánů i jejich morfologie s tím rozdílem, že dospělci drápatky jsou schopni regenerovat tkáně (jako optický nerv či čočku a podobně) i po metamorfóze. (Tandon et al., 2016). Další směr výzkumu těchto buněk by se měl věnovat možné koexistenci buněk s buňkami z jiných živočichů a také s lidskými.

Mohly by snad tyto buňky být v budoucnu používány v regenerativní medicíně jako náhrada za lidské kmenové buňky, které je tak těžké získávat?

Literatura

- BLACKISTON, D., L. N. VANDENBERG a M. LEVIN. High-Throughput *Xenopus laevis* Immunohistochemistry Using Agarose Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010, **2010**(12), 1-13. DOI: 10.1101/pdb.prot5532. ISSN 1559-6095.
- BUTLER, Karen, Aaron M. ZORN a J.B. GURDON. Nonradioactive in Situ Hybridization to *Xenopus* Tissue Sections. *Methods*. 2001, **23**(4), 303-312. DOI: 10.1006/meth.2000.1142. ISSN 1046-2023.
- CAZARES, Lisa H, Sean A VAN TONGEREN, Julie COSTANTINO, et al. Heat fixation inactivates viral and bacterial pathogens and is compatible with downstream MALDI mass spectrometry tissue imaging. *BMC Microbiology*. 2015, **15**(1), 1-11. DOI: 10.1186/s12866-015-0431-7. ISSN 1471-2180.
- CONIGLIARO, A, L AMICONE, V COSTA, et al. Evidence for a common progenitor of epithelial and mesenchymal components of the liver. *Cell Death and Differentiation*. 2013, **20**(8), 1116-1123. DOI: 10.1038/cdd.2013.49. ISSN 1350-9047.
- COOL, J., F.D. CARMONA, J.C. SZUCSIK a B. CAPEL. Peritubular Myoid Cells Are Not the Migrating Population Required for Testis Cord Formation in the XY Gonad. *Sexual Development*. 2008, **2**(3), 128-133. DOI: 10.1159/000143430. ISSN 1661-5433.
- DUBAISSI, E. a N. PAPALOPULU. Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Disease Models & Mechanisms*. 2011, **4**(2), 179-192. DOI: 10.1242/dmm.006494. ISSN 1754-8403.
- EINAGA, Naoki, Akio YOSHIDA, Hiroko NODA, et al. Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. *Plos One*. 2017, **12**(5), 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0176280. ISSN 1932-6203.
- FALLARINO, Francesca, Giovanni LUCA, Mario CALVITTI, et al. Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated Sertoli cell xenografts alone. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009, **206**(11), 2511-2526. DOI: 10.1084/jem.20090134. ISSN 0022-1007.

- FRANKE, WW, C GRUND a E SCHMID. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *European Journal of Cell Biology*. 1979, **19**(3), 269-275. ISSN 0171-9335.
- GONG, Daoyuan, Chunfu ZHANG, Jiahui ZHANG, Nannan ZHANG, Zehua TAO, Wei ZHU a Xiaochun SUN. Are Sertoli cells a kind of mesenchymal stem cells? *American Journal of Translation Research*. 2017, **9**(3), 1067-1074. ISSN 1943-8141.
- GRAVAGNA, Nicole G., Christopher S. KNOECKEL, Alison D. TAYLOR, Barbara A. HULTGREN a Angeles B. RIBERA. Localization of Kv2.2 protein in *Xenopus laevis* embryos and tadpoles. *The Journal of Comparative Neurology*. 2008, **510**(5), 508-524. DOI: 10.1002/cne.21804. ISSN 0021-9967.
- GURDON, John B. a Nick HOPWOOD. The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*. 2000, **44**(1), 43-50. ISSN 0214-6282.
- HARLAND, Richard M. a Robert M. GRAINGER. *Xenopus* research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends in Genetics*. 2011, **27**(12), 507-515. DOI: 10.1016/j.tig.2011.08.003. ISSN 0168-9525.
- HELLSTEN, U., R. M. HARLAND, M. J. GILCHRIST, et al. The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus tropicalis*. *Science*. 2010, **328**(5978), 633-636. DOI: 10.1126/science.1183670. ISSN 0036-8075.
- HUEBINGER, Jan, Hong-Mei HAN, Markus GRABENBAUER a Boris RUBINSKY. Reversible Cryopreservation of Living Cells Using an Electron Microscopy Cryo-Fixation Method. *Plos One*. 2016, **11**(10), 1-16. DOI: 10.1371/journal.pone.0164270. ISSN 1932-6203
- CHEN, Anqi, Jixi LI, Lesheng SONG, Chaoneng JI, Marion BÖING, Jinzhong CHEN a Beate BRAND-SABERI. GGNBP2 is necessary for testis morphology and sperm development. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 1-8. DOI: 10.1038/s41598-017-03193-y. ISSN 2045-2322.

- IDDAWELA, Mahesh, Oscar RUEDA, Jenny EREMIN, Oleg EREMIN, Jed COWLEY, Helena M. EARL a Carlos CALDAS. Integrative analysis of copy number and gene expression in breast cancer using formalin-fixed paraffin-embedded core biopsy tissue: a feasibility study. *BMC Genomics*. 2017, **18**(1), 1-13. DOI: 10.1186/s12864-017-3867-3. ISSN 1471-2164.
- KASHIWAGI, Keiko, Akihiko KASHIWAGI, Atsushi KURABAYASHI, Hideki HANADA, Keisuke NAKAJIMA, Morihiro OKADA, Minoru TAKASE a Yoshio YAOITA. *Xenopus tropicalis*: An Ideal Experimental Animal in Amphibia. *Experimental Animals*. 2010, **59**(4), 395-405. DOI: 10.1538/expanim.59.395. ISSN 1881-7122.
- KAUR, Gurvinder, Lea Ann THOMPSON a Jannette M. DUFOUR. Sertoli cells – Immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014, **30**, 36-44. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.02.011. ISSN 1084-9521.
- KIM, Ye-Seul, Bo-Rim YI, Nam-Hyung KIM a Kyung-Chul CHOI. Role of the epithelial–mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 2014, **46**(8), e108. DOI: 10.1038/emm.2014.44. ISSN 2092-6413.
- LAU, Melissa, Jianli LI a Hollis T. CLINE. In Vivo Analysis of the Neurovascular Niche in the Developing *Xenopus* Brain. *ENeuro*. 2017, **4**(4), 1-24. DOI: 10.1523/ENEURO.0030-17.2017. ISSN 2373-2822.
- LERCH, Melissa L., Daniel R. BAUER, David CHAFIN, Abbey THEISS, Michael OTTER a Geoffrey S. BAIRD. *Precision Medicine Starts With Preanalytics*. 2017, **25**(3), 160-167. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000489. ISSN 1541-2016.
- MAGNANTI, Massimo, Orietta GANDINI, Laura GIULIANI, et al. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood*. 2001, **98**(9), 2872-2874. DOI: 10.1182/blood.V98.9.2872. ISSN 0006-4971.
- MAGNANTI, Massimo, Orietta GANDINI, Laura GIULIANI, et al. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood*. 2001, **98**(9), 2872-2874. DOI: 10.1182/blood.V98.9.2872. ISSN 0006-4971.

- MAHADEVAPPA, Asha, Thattamparambil G. NISHA a Gubbanna V. MANJUNATH. Intra-operative Diagnosis of Breast Lesions by Imprint Cytology and Frozen Section with Histopathological Correlation. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017, **11**(3), 1-6. DOI: 10.7860/JCDR/2017/24454.9323. ISSN 2249-782x.
- MALEKI, Masoud, Farideh GHANBARVAND, Mohammad Reza BEHVARZ, Mehri EJTEMAEI a Elham GHADIRKHOMI. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*. 2014, **7**(2), 118-126. DOI: 10.15283/ijsc.2014.7.2.118. ISSN 2005-3606.
- MARDONES, Rodrigo, Claudio M. JOFRÉ, L. TOBAR a José J. MINGUELL. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of hip osteoarthritis. *Journal of Hip Preservation Surgery*. 2017, **4**(2), 159-163. DOI: 10.1093/jhps/hnx011. ISSN 2054-8397.
- MATSUI, Takahiro, Takanori ONOUCHI, Kazuya SHIOGAMA, et al. Coated Glass Slides TACAS Are Applicable to Heat-Assisted Immunostaining and *In Situ* Hybridization at the Electron Microscopy Level. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 2015, **48**(5), 153-157. DOI: 10.1267/ahc.15012. ISSN 0044-5991.
- NIEUWKOOP, Pieter D. a Jacob FABER. *Normal table of Xenopus laevis (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. New York: Garland Pub., 1994. ISBN 978-0815318965.
- SATODA, Masahiko, Shin TAKAGI, Kunimasa OHTA, Tatsumi HIRATA a Hajime FUJISAWA. Differential Expression of Two Cell Surface Proteins, Neuropilin and Plexin, in Xenopus Olfactory Axon Subclasses. *The Journal of Neuroscience*. 1995, **15**(1), 942-955. ISSN 0270-6474.
- SHALET, Stephen M. *Normal testicular function and spermatogenesis*. 2009, **53**(2), 285-288. DOI: 10.1002/pbc.22000. ISSN 15455009.
- SCHLATT, Stefan, Gerhard F. WIENBAUER a Eberhard NIESCHLAG. Appearance of α -Smooth Muscle Actin in Peritubular Cells of Monkey Testes Is Induced by Androgens, Modulated by Follicle-Stimulating Hormone, and Maintained after Hormonal Withdrawal. *Journal of Andrology*. 1993, **14**(5), 340-350. ISSN 1939-4640.

- TAM, Beatrice M., Lee Ling YANG, Tami H. BOGÉA, Bradford ROSS, Garnet MARTENS a Orson L. MORITZ. Preparation of *Xenopus laevis* retinal cryosections for electron microscopy. *Experimental Eye Research*. 2015, **136**, 86-90. DOI: 10.1016/j.exer.2015.05.014. ISSN 0014-4835.
- TANDON, Panna, Frank CONLON, J. David FURLOW a Marko E. HORB. Expanding the genetic toolkit in *Xenopus*: Approaches and opportunities for human disease modeling. *Developmental Biology*. 2016, **426**(2), 325-335. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.04.009. ISSN 0012-1606.
- TLAPAKOVA, Tereza, Thi Minh Xuan NGUYEN, Marketa VEGRICHTOVA, Monika SIDOVA, Karolina STRNADOVA, Monika BLAHOVA a Vladimir KRYLOV. Identification and characterization of *Xenopus tropicalis* common progenitors of Sertoli and peritubular myoid cell lineages. *Biology Open*. 2016, **5**(9), 1275-1282. DOI: 10.1242/bio.019265. ISSN 2046-6390.
- TUNG, Pierre S. a Irving B. FRITZ. Interactions of Sertoli Cells with Myoid Cells in vitro. *Biology of Reproduction*. 1980, **23**(1), 207-217. DOI: 10.1093/biolreprod/23.1.207. ISSN 0006-3363.
- ULMER, Bärbel, Melanie TINGLER, Sabrina KURZ, et al. A novel role of the organizer gene *Goosecoid* as an inhibitor of Wnt/PCP-mediated convergent extension in *Xenopus* and mouse. *Scientific Reports*. 2017, **7**, 43010. DOI: 10.1038/srep43010. ISSN 2045-2322.
- WELSH, M., P. T. K. SAUNDERS, N. ATANASSOVA, R. M. SHARPE a L. B. SMITH. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *The FASEB Journal*. 2009, **23**(12), 4218-4230. DOI: 10.1096/fj.09-138347. ISSN 0892-6638.
- ZANG, Li, Haojie HAO, Jiejie LIU, Yijun LI, Weidong HAN a Yiming MU. Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2017, **9**(1), 1-11. DOI: 10.1186/s13098-017-0233-1. ISSN 1758-5996